

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. Podbielski

**Phänotypische und Genotypische Differenzierung von *Escherichia coli*-
Stämmen bei Patienten mit chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen
unter Autovakzinetherapie**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

Vorgelegt von
Ellen Mann
aus Ludwigslust
Rostock, 2009

urn:nbn:de:gbv:28-diss2011-0062-5

Dekan: Prof. Dr. med. E. Chr. Reisinger

1. Gutachter: Prof. em.Dr.med. H. Schmidt

2. Gutachter: Prof. Dr. med. D. Haffner, Universitäts Kinder- und Jugendklinik

Rostock, Ernst-Heydemann-Strasse 8, 18057 Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. W. Solbach, Institut für Mikrobiologie und Hygiene,
Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck

eingereicht am: 27.03.2009

verteidigt am: 23.03.2010

1	EINLEITUNG.....	6
1.1	Definition und Einteilung der Harnwegsinfektion.....	6
1.2	Epidemiologie.....	6
1.3	Erregerspektrum	7
1.4	Pathogenese der Harnwegsinfektion	7
1.5	Klinische Symptome und Diagnose der Harnwegsinfektion	8
1.6	Therapie der Harnwegsinfektion.....	9
1.6.1	Antibiotikatherapie	9
1.6.2	Immunstimulierende Therapie – alternative Therapieansätze.....	10
1.7	Virulenzfaktoren.....	11
1.8	Phänotypisierende Feindifferenzierungsmethoden von <i>Escherichia coli</i>	12
1.8.1	Serotypisierung	12
1.8.2	Biochemotypisierung	13
1.9	Genotypisierende Feindifferenzierungsmethode von <i>Escherichia coli</i>	14
1.9.1	Pulsfeld-Gelelektrophorese.....	14
2	ZIELSTELLUNG	15
3	MATERIAL UND METHODEN.....	16
3.1	Auswahl der Stämme.....	16
3.1.1	Materialien	16
3.2	Methoden.....	19
3.2.1	Anzucht und Biochemische Identifizierung	19
3.2.2	Serotypisierung	19
3.2.3	Hämagglutination.....	21
3.3	Charakterisierung der klonalen Identität.....	22
3.3.1	Biochemotypisierung	22
3.3.2	Biochemischer Code	23
3.3.3	Genotypisierung mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese	24
3.4	Herstellung der Autovakzine	27
3.4.1	Impf- und Dosierungsschema	28
4	ERGEBNISSE	29
Patientin 1	33	
4.1.1	Vakzinierung.....	33
4.1.2	Bakterienstammcharakterisierung.....	34
4.2 Patientin 2.....	37	
4.2.1	Vakzinierung.....	37
4.2.2	Bakterienstammcharakterisierung.....	38
4.3 Patientin 3.....	41	
4.3.1	Vakzinierung.....	41
4.3.2	Bakterienstammcharakterisierung.....	42

4.4	Patientin 4.....	45
4.4.1	Vakzinierung.....	45
4.4.2	Bakterienstammcharakterisierung.....	46
4.5	Patientin 5.....	49
4.5.1	Vakzinierung.....	49
4.5.2	Bakterienstammcharakterisierung.....	50
4.6	Patientin 6.....	52
4.6.1	Vakzinierung.....	52
4.6.2	Bakterienstammcharakterisierung.....	53
4.7	Patientin 7.....	55
4.7.1	Vakzinierung.....	55
4.7.2	Bakterienstammcharakterisierung.....	56
4.8	Patientin 8.....	60
4.8.1	Vakzinierung.....	60
4.8.2	Bakterienstammcharakterisierung.....	61
4.9	Patientin 9.....	64
4.9.1	Vakzinierung.....	64
4.9.2	Bakterienstammcharakterisierung.....	65
4.10	Patientin 10.....	68
4.10.1	Vakzinierung.....	68
4.10.2	Bakterienstammcharakterisierung.....	69
4.11	Patientin 11.....	72
4.11.1	Vakzinierung.....	72
4.11.2	Bakterienstammcharakterisierung.....	74
4.12	Patient 12.....	79
4.12.1	Vakzinierung.....	79
4.12.2	Bakterienstammcharakterisierung.....	80
4.13	Zusammenfassender Vergleich einzelner Patientenergebnisse untereinander	83
4.13.1	Vorkommen verschiedener O-Serovare und Korrelation mit dem Biochemo- und Genotyp.....	83
4.13.2	Zuordnung von nicht O-typisierbaren Stämmen und Rauformen mit Hilfe der Biochemo- und Genotypisierung	84
4.13.3	Auswertung der Rezidive und Reinfektionen bei den einzelnen Patienten	86
4.13.4	Ergebnisse der Vakzinierungen.....	87
5	DISKUSSION	89
5.1	Vergleich der Übereinstimmung der Feindiskriminierung bei Kombination von Sero- und Biochemotypisierung und Sero- und Genotypisierung.....	92
5.2	Rezidiv oder Reinfektion?.....	93
5.3	Was brachte die Autovakzinierung?.....	94
5.4	Schlussfolgerungen	94
6	ZUSAMMENFASSUNG	96
7	LITERATURVERZEICHNIS	98
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	104

1 Einleitung

1.1 Definition und Einteilung der Harnwegsinfektion

Die Harnwegsinfektion (HWI) ist durch die Anwesenheit von mikrobiellen Erregern, die im Harntrakt eine Infektion auslösen, sowie durch die lokale Abwehrreaktion des betroffenen Menschen definiert (32). Zusammen führt dies zur akuten Infektion, die durch die Leitsymptome Pollakisurie und Dysurie gekennzeichnet ist. Bei chronischen Verläufen sind die Symptome weniger ausgeprägt bzw. können ganz fehlen.

Zur Einteilung der HWI werden die Lokalisation der Infektion, Wirtsfaktoren sowie der Krankheitsverlauf herangezogen. Die akute unkomplizierte HWI der Frau und die akute unkomplizierte Pyelonephritis sind HWI ohne komplizierende Wirtsfaktoren.

Kommt es bei Vorhandensein von Harnabflussstörungen (z.B. durch Obstruktion, neurogene oder funktionelle Harnblasenentleerungsstörungen), Grunderkrankungen (z.B. Diabetes mellitus) oder disponierenden Faktoren (z.B. Schwangerschaft, Immunsuppression, hohes Alter) zu einer HWI, so handelt es sich um eine komplizierte HWI. Weiterhin gilt jede HWI nach Harnableitungen als komplizierte HWI (4,36,43,55).

Von einer asymptomatischen Bakteriurie wird bei nachweisbarer Leukozyt- und Bakteriurie ohne klinische Symptomatik gesprochen.

Erleidet eine Patientin mindestens drei durch Urinkulturen nachgewiesene Episoden einer akuten unkomplizierten HWI in einem Jahr, so spricht man von einer rezidivierenden HWI (22,25,55,68).

1.2 Epidemiologie

Harnwegsinfektionen sind neben den Infektionen der oberen Atemwege die am häufigsten auftretenden Infektionen im ambulanten Bereich. Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Alter der betroffenen Patienten und dem Geschlecht. Die Prävalenz beträgt im Säuglingsalter 1 %, steigt im Schulalter auf 2 -3 % und erreicht bei den Erwachsenen 2,5 %. Im Alter liegt die Prävalenz zwischen 20 und 30 %. Während neonatal Jungen etwas häufiger erkranken als Mädchen (Verhältnis: 1,5:1), so ist das weibliche Geschlecht ab dem Vorschulalter häufiger betroffen als das männliche Geschlecht. Das Verhältnis der Prävalenz der HWI männlich zu weiblich beträgt nach der Pubertät 1:30 und erreicht im Erwachsenenalter aufgrund gesteigerter sexueller Aktivität und Schwangerschaften 1:50. Erst im Alter erkranken Männer aufgrund obstruktiver Harnabflussstörungen auch wieder vermehrt an einer HWI, so dass das Verhältnis männlich zu weiblich bei 1:10 bis 1:2 liegt. Unter Pflegeheimbewohnern sind Männer und Frauen gleichermaßen betroffen (22,48).

Aus den USA ist bekannt, dass jährlich ca. 8 Mio. Menschen wegen einer Harnwegsinfektion behandelt werden müssen. Bei etwa 100 000 Patienten wird wegen einer akuten Pyelonephritis eine stationäre Therapie notwendig (22). In Deutschland erkranken jährlich über 2 Mio. Menschen an einer Harnwegsinfektion (28). Nach Angaben von Huland und Conrad sind 95 % der Patienten in der urologischen Praxis Frauen, die wegen einer rezidivierenden Bakteriurie behandelt werden. 5 -10 % aller Frauen leiden an einer rezidivierenden Harnwegsinfektion (36).

1.3 Erregerspektrum

Der am häufigsten im Zusammenhang mit HWI nachgewiesene Keim ist *Escherichia coli*. Er verursacht 80 – 90 % der Zystitiden und über 90 % der Pyelonephritiden (4,55,59,90).

Unkomplizierte Harnwegsinfektionen werden in 80 – 90 % der Fälle durch *Escherichia coli* gefolgt von *Staphylococcus saprophyticus* (11 %) und Klebsiellen, Proteus sowie Enterokokken mit jeweils 2 % verursacht.

Im Gegensatz dazu sind die komplizierten oder nosokomialen Harnwegsinfektionen nur zu ca. 30 % durch *Escherichia coli* verursacht. Enterokokken und *Proteus mirabilis* sind für jeweils 10-15 % der Fälle verantwortlich. Andere Erreger wie *Staphylococcus epidermidis* werden in 5-10 %, Klebsiellen in 7 % und *Pseudomonas aeruginosa* in 4-5 % der Fälle als verantwortliche Erreger isoliert (25,59). Neben der bakteriellen Infektion sind bei der komplizierten HWI auch Pilzinfektionen von Bedeutung. In ca. 5 – 6 % der Fälle werden Harnwegsinfektionen durch *Candida* spp. hervorgerufen (26,44).

1.4 Pathogenese der Harnwegsinfektion

Die häufigste Ursache einer HWI ist die Aszension von uropathogenen Erregern (22). Enterobakterien, die einerseits zur normalen Darmflora zählen, bedingen andererseits durch Akquirierung von bestimmten Virulenzfaktoren am häufigsten HWI. Damit potentiell uropathogene *E. coli*-Stämme urogenitale Epithelien besiedeln können, exprimieren sie Adhäsine wie Typ-1-, P- und S-Fimbrien, die an den entsprechenden Rezeptoren des Epithels binden. Rezeptoren für Typ-1 und P-Fimbrien findet man auf den Plattenepithelien des Introitus vaginae und auf dem Uroepithel der Blase, des Harnleiters sowie des Nierenbeckenkelchsystems. Die Rezeptordichte für P-Fimbrien ist auf den Vaginalepithelzellen sowie in der Niere besonders hoch (36). Der Zytoadhärenz schließt sich die Aszension der Infektionserreger von der periurethralen Region über die Urethra in die Harnblase an. Hier können die Keime eine akute Zystitis verursachen. Die Pyelonephritis ist

das Ergebnis einer weiteren Aszension der Erreger vom unteren harnableitenden Trakt über die Ureteren in das Nierenbeckenkelchsystem und das Nierenparenchym (20,90).

Durch genetische Untersuchungen wurden identische *E. coli*-Stämme in parallel untersuchten Proben aus Vaginalabstrichen und aus Mittelstrahlurinen nachgewiesen. Damit wurde die Hypothese des „fecal-perineal-urethralen“ Infektionsweges bestätigt, wobei der Darm als Reservoir für die uropathogenen Keime dient (53,54,58,86,93).

Im Rahmen der lokalen Immunantwort werden Zytokine und proinflammatorische Faktoren sezerniert. Granulozyten, Makrophagen und Monozyten wandern in das betroffene Gewebe ein, und eine lokale Entzündungsreaktion wird ausgelöst (22,85).

Eine manifeste HWI, insbesondere bei Befall der oberen Harnwege, kann durch hämatogene Streuung zu einer Urosepsis führen (90).

Zu den Risiken und begünstigenden Faktoren, die der Entwicklung einer HWI zuträglich sind, zählen anatomische Fehlbildungen im urogenitalen System mit konsekutiven Harnabflussstörungen bei Neugeborenen. Bei der Frau steigt die Infektionsrate mit Eintritt in die sexuell aktive Phase durch die anatomischen Gegebenheiten von kurzer Urethra und der anatomischen Nähe von perinealer und periurethraler Region sprunghaft an (47,59,90).

Bei Männern wird das Auftreten von Harnwegsinfektionen durch obstruktive Harnabflussstörungen wie z.B. bei der Prostatahyperplasie begünstigt. Weiter sind medizinische Eingriffe und anatomische Abnormitäten zu nennen (59).

Ein geschlechts- und altersunabhängiger prädisponierender Faktor ist das Vorhandensein von Restharn, z.B. bei neurogener Blasenentleerungsstörung, urethraler Stenose und als Folge von Senkungen der Gebärmutter und / oder der Blase, Multipler Sklerose, Querschnittslähmung und Diabetes mellitus (47,59).

1.5 Klinische Symptome und Diagnose der Harnwegsinfektion

Die Klinik der HWI besteht aus Dysurie, Pollakisurie und suprapubischem Schmerz. Diese Symptome sprechen vornehmlich für eine untere Harnwegsinfektion. Kommen Beschwerden wie Flankenschmerzen und Fieber hinzu, so ist eher von einer Infektion der oberen Harnwege auszugehen (52,90). Nach eingehender klinischer Untersuchung bestätigt die Urinanalyse die Diagnose. Der Urinstatus gibt eine Aussage zum Vorliegen einer möglichen Infektion. Leukozyturie, Erythrozyturie und ein positives Nitrit sprechen für eine Harnwegsinfektion. Durch die Urinkultur werden die Erreger spezifiziert, ein Antibiotikaresistogramm erstellt und das Ausmaß der Bakteriurie festgestellt.

Wie bei jeder Infektion gibt es auch bei der HWI eine Beziehung zwischen quantitativer Erregermenge und Beginn bzw. Ausprägung der klinischen Symptomatik. Da die Erreger am eigentlichen Ort der Infektion, den Epithelien der Harnwege, nicht quantitativ fassbar sind,

wird bei bestehender HWI-Symptomatik zur weiteren Abklärung als Äquivalent die Keimzahlmenge im Urin gemessen. Die quantitative Bestimmung ist notwendig, weil der Urin je nach Abnahmeart oder Begleitumständen (z.B. Katheterisierung) auch Keime der physiologischen Flora der vorderen Harnröhre enthalten kann. Bei einer Analyse des Urins zum Nachweis einer HWI werden als Mindestparameter die Gesamtkeimzahl pro Volumenbezugsgröße (typisch 1 ml) und die Zahl der kultivierbaren Keimarten erfasst. Mit der Ausnahme von Dauerkatheterurin gilt der Nachweis von drei und mehr Keimarten als Indiz für die Kontamination des Urins mit Harnröhren- oder Darmflora. Im Falle des Nachweises von nur einer oder zwei Keimarten, die zudem erfahrungsgemäß im ätiologischen Zusammenhang mit HWI stehen, gibt es quantitative Grenzwerte, bei deren Überschreiten das Vorliegen einer HWI sehr wahrscheinlich ist. Diese Grenzwerte hängen zunächst von der Abnahmetechnik für die Urinprobe ab. Katheter- oder Beutelurin enthält in aller Regel mehr kontaminierende Mikroflora als Blasenpunktionsurin. Zudem hängen die Grenzwerte vom Geschlecht und Alter der Patienten sowie von einer Reihe von disponierenden Grunderkrankungen (z.B. Diabetes mellitus) oder iatrogen bedingter Zustände (z.B. Dauerkatheterismus) und schließlich von der Erregerart (z.B. Pilze) ab. In großem Umfang erforscht sind die Grenzwerte nur für Frauen mit bakteriell bedingter HWI im gebärfähigen Alter. Hier gilt die so genannte Kass'sche Zahl von $\geq 10^5$ pathogenen Bakterien / ml Mittelstrahlurin (39).

Die Notwendigkeit einer Urinkultur bei einer einfachen unkomplizierten Zystitis ist allein wegen der Kosten umstritten (59,90). In der Regel wird mit einer antibiotischen Kurztherapie über drei Tage begonnen. Sollte die Therapie in den ersten zwei Tagen keinen Erfolg zeigen, oder erleidet der Patient in kurzer Zeit einen Rückfall mit gleichartigen Symptomen, so ist eine Abklärung durch eine Urinkultur mit Antibiotogramm unumgänglich (59). Bei Patienten mit rezidivierenden Harnwegsinfektionen und / oder bekannten anatomischen Abnormitäten sollte immer eine mikrobiologische Untersuchung des Urins veranlasst werden (59).

1.6 Therapie der Harnwegsinfektion

1.6.1 Antibiotikatherapie

Bei der Therapie von Harnwegsinfektionen ist wegen der besseren Wirksamkeit Antibiotika der Vorzug zu geben, die renal eliminiert werden.

Die am häufigsten auftretende unkomplizierte untere Harnwegsinfektion kann durch eine orale Kurzzeittherapie über ein bis drei Tage mit Trimethoprim allein oder in Kombination mit einem Sulfonamid sowie mit Fluorchinolonen oder Cephalosporinen der Gruppe 2 und 3

therapiert werden (34,87). Bei alleiniger Anwendung von Trimethoprim sollte die Resistenzrate der regional nachgewiesenen *E. coli*-Stämme unter 10 -20 % liegen.

Die Therapie der akuten unkomplizierten Pyelonephritis wird oral mit Antibiotika aus der Gruppe der Fluorchinolone, der Cephalosporine der Gruppe 2 und 3 oder mit einem Aminopenicillin in Kombination mit einem Betalaktamaseinhibitor durchgeführt. Bei Bestehen schwerer Allgemeinsymptome wie Übelkeit und Erbrechen ist die initial parenterale Medikamentenapplikation indiziert. Die Länge der Therapie richtet sich nach dem klinischen Verlauf.

Bei einer komplizierten Harnwegsinfektion kann eine Antibiotikatherapie nur dann kurativen Charakter haben, wenn komplizierende Faktoren beseitigt werden konnten. Nosokomiale und katheterassoziierte Infektionen spielen aufgrund der häufig multiplen Antibiotikaresistenzen der Erreger eine besondere Rolle. Die Behandlung erfolgt parenteral. Es werden beginnend Cephalosporine der Gruppe 2 oder 3a, Fluorchinolone mit guter renaler Elimination oder Aminopenicilline in Kombination mit Betalaktamaseinhibitoren eingesetzt. Ist nach 2 bis 3 Tagen keine klinische Besserung feststellbar, sollte die Therapie auf ein pseudomonaswirksames Acylaminopenicillin + Betalaktamaseinhibitor, ein Cephalosporin der Gruppe 3b oder ein Carbapenem umgestellt werden.

Die Behandlung einer asymptomatischen Bakteriurie ist nur bei Vorliegen von Risikofaktoren wie z.B. Gravidität, vesikoureteralem Reflux oder einem Zustand nach Nierentransplantation indiziert. Bei Vorliegen eines Diabetes mellitus, einer Immunsuppression oder einer eingeschränkten Nierenfunktion wird die Notwendigkeit der antibiotischen Therapie unterschiedlich beurteilt.

Bei rezidivierenden Harnwegsinfektionen wird eine Reinfektionsprophylaxe mit Trimethoprim alleine oder in Kombination mit Sulfamethoxazol oder Sulfamerazin und Nitrofurantoin oral in reduzierter Dosis über sechs Monate empfohlen. Treten Zystitiden gehäuft nach Geschlechtsverkehr auf, so ist außer der postkoitalen Blasenentleerung eine prophylaktische Einmalgabe der genannten Substanzen sinnvoll (56,83).

1.6.2 Immunstimulierende Therapie – alternative Therapieansätze

Die antimikrobielle Therapie hat sich bei rezidivierend auftretenden Harnwegsinfektionen als nicht ausreichend erwiesen (57). Eine mögliche Therapiealternative bei chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen ist die Stimulierung des Immunsystems durch die Applikation von Vakzinen. Uro-Vaxom®, ein Immuntherapeutikum, besteht aus lysierten immunaktiven Fraktionen von 18 *E. coli*-Stämmen und bietet den Vorteil der oralen Darreichungsform. Durch die Verabreichung der Vakzine wird die lokale

Schleimhautimmunität verbessert (10,35,57,73,76). Die Rezidivhäufigkeit konnte um bis zu 65 % bei Anwendung von Uro-Vaxom® signifikant gesenkt werden (5,46,81).

Als eine weitere Möglichkeit der Immunstimulation wurde seit 1989 an der Universität Rostock die Autovakzinetherapie wieder aufgenommen. Dabei wurde dem Patienten der eigene Erreger, der aus der Urinprobe angezüchtet wurde, als abgetötete Vollkeimvakzine i.m. appliziert. Es wurden ausschließlich Patienten therapiert, die unter rezidivierenden Harnwegsinfektionen, hervorgerufen durch *E. coli*, litten. Durch die Autovakzinetherapie konnte die Anzahl der Infektionen gesenkt und auf eine Antibiotikatherapie häufig verzichtet werden (80,91).

1.7 Virulenzfaktoren

Virulenz ist die quantitativ definierte Angriffskraft konkret fassbarer Mikroorganismen, d.h. das Ausmaß von deren Fähigkeit, in einen Organismus einzudringen, sich dort zu vermehren und ihn toxisch zu schädigen. Die Virulenz von Mikroorganismen wird durch Virulenzfaktoren vermittelt.

Alle *E. coli*-Stämme exprimieren das sog. Endotoxin, ein Bestandteil der äußeren Membran der Bakterien. Das Endotoxin ist ein Zucker-Fett-Lipid-Polymer (Lipopolysaccharid = LPS). Der Lipidanteil des LPS bewirkt die Produktion und Freisetzung von Zytokinen und aktiviert das Komplement- und Koagulationssystem, was dann zur bekannten Gram-negativen Sepsis oder auch Urosepsis führen kann.

Zu den wichtigsten stammspezifischen Virulenzfaktoren von *Escherichia coli* zählen die Adhäsine, durch die *E. coli* überhaupt erst an den Epithelien des Perineums, der Vagina und des Harntraktes haften kann. Unter diesen sind insbesondere P- und Typ 1- Fimbrien zu nennen. P-Fimbrien sind Mannose-resistente Adhäsine, die an das Disaccharid Mannosehaltiger Glycolipide binden, wie sie auf Epithelzellen des Harntraktes sowie auf Erythrozyten der Blutgruppensubstanz P vorkommen (3,22,59,90). Sie kommen zu fast 100 % bei Stämmen vor, die eine Pyelonephritis verursachen, aber nur bei 65 % der Zystitis verursachenden Stämme. Liegt eine asymptomatische Bakteriurie vor, sind P-Fimbrien sogar nur zu 20 % nachweisbar (3,59). P-Fimbrien wehren die Phagozytose ab. Typ 1-Fimbrien sind Mannose-sensitive Adhäsine. Sie erhöhen die Phagozytenaktivität und bedingen dadurch eine Entzündungsreaktion (59).

Zusätzlich fördert der von *E. coli* produzierte Zell-Nekrose-Faktor 1 (CNF1) die Adhäsion und Invasion am Uroepithel und induziert die inflammatorische Wirtsantwort (33,72).

Ein weiterer Virulenzfaktor ist das Hämolysin, das Erythrozyten aber auch renale Tubuluszellen zu zerstören vermag. Dadurch erlangen die Erreger Eisen für ihren

Zellstoffwechsel. Die Sicherstellung der Eisenaufnahme für *E. coli* erfolgt durch die Produktion von Aerobactin, welches Eisen von den Wirtszellen für den aeroben Stoffwechsel der Bakterien akquiriert (19,21,76,89,90).

Für die Bewegung gegen den physiologischen Harnabfluss besitzt *E. coli* Geißeln, das H-Antigen. Ein weiterer Virulenzfaktor ist das Kapsel-Antigen (K-Antigen), ein Polysaccharid, das die Bakterienkapsel bildet. Diese schützt das Bakterium vor dem angreifenden Immunsystem des Wirtes durch Unterlaufen der Wirkungen des Komplementsystems und Hemmung der Phagozytose (90).

Wie genetische Untersuchungen zeigten, werden die Virulenzfaktoren vornehmlich in bestimmten Abschnitten des Genoms, in den so genannten pathogenetischen Inseln (PAI), verschlüsselt. PAI sind häufig instabile Regionen, die relativ leicht aus dem Genom desintegriert oder in es inseriert werden können. Sie unterliegen dem horizontalen Gentransfer und können so durch andere Bakterien akquiriert werden. Bei den uropathogenen *E. coli*-Stämmen werden P-Fimbrien, der Zell-Nekrose-Faktor 1 (CNF1), Hämolysin und Kapselbildung von in PAI organisierten Genen kodiert. Auch Gene für die suffiziente Sicherstellung des Eisenstoffwechsels liegen auf PAIs (28,29).

1.8 Phänotypisierende Feindifferenzierungsmethoden von *Escherichia coli*

1.8.1 Serotypisierung

Von jedem *E. coli*-Isolat kann eine Serovar-Formel erstellt werden, die auf dem Aufbau des Bakteriums basiert. In die Serotypisierung gehen das O-, H- und K-Antigen ein. Einige *E. coli*-Stämme bilden eine Polysaccharidschleimkapsel (K-Antigen), welche die äußere Membran umhüllt. Sie kann durch Erhitzen auf 100 °C zerstört werden.

Die äußere Membran von Gram-negativen Bakterien enthält das in ihr fest verankerte Lipopolysaccharid, welches dreiteilig aufgebaut ist. Es besteht aus dem Lipid A, einem Endotoxin, einer wenig variablen Kernregion und den Seitenketten. Die Seitenketten bilden das stammspezifische O-Antigen. Sie rufen im Organismus die Bildung O-spezifischer Antikörper hervor. Durch Verlust der Seitenketten und damit des O-Antigens entstehen die Rauhformen, die auf Nähragar als matte Kolonien wachsen und in NaCl-Lösung spontan autoagglutinieren.

Durch den Besitz von Geißeln, die das H-Antigen verkörpern, können sich Bakterien aktiv fortbewegen (12,79).

Seit Beginn des 20. Jahrhunderts beschäftigte sich die Arbeitsgruppe um Kauffmann mit der Serotypisierung von *E. coli*-Stämmen (40,41). 1992 waren 173 O-Antigene, 80 K-Antigene und 56 H-Antigene bekannt (65). Die Bezeichnung der Serovare der drei Antigene erfolgt

durch Nennung des Antigenkürzels und einer willkürlich gewählten Ordinierungszahl für das jeweilige Serovar. Aufgrund der freien Kombinierbarkeit der einzelnen Antigene ist von einer hohen Anzahl verschiedener Serotypen auszugehen. In der Praxis konnte gezeigt werden, dass aber nur eine relativ geringe Anzahl von Serovaren von Bedeutung ist (61). So gehören die Serovare O1, O2, O6, O18 und O75 zu den uropathogenen *E. coli*-Stämmen (UPEC) (31). Weiterhin konnte eine Beziehung zwischen dem O : H : K-Serotyp und der Lokalisation der Harnwegsinfektion hergestellt werden (31,61,66). Nach Nimmich und Zingler (61) verursachen O1:K1:H7-Stämme, O2:K1:H4-Stämme, O4:K12:H5-Stämme, O6:K2:H1-Stämme und O16:K1:H6-Stämme Pyelonephritiden. O6:K13:H1-Stämme und O75:K+:H5-Stämme sind dagegen für Zystitiden verantwortlich. Und Stämme mit der Serovar O2:K1:H4, O7:K1:H1, O18:K5:H- und O75:K5:H5 wurden bei Patienten mit Pyelonephritis ebenso isoliert wie bei Patienten mit Zystitis.

1.8.2 Biochemotypisierung

Die Stoffwechseleigenschaften von *E. coli* dienen der Subdifferenzierung der Serovare in Biochemotypen. Dabei werden das Fermentationsvermögen verschiedener Zucker und die Verstoffwechselung von Aminosäuren getestet. Die in den Code eingehenden Reaktionen sind in der Literatur unterschiedlich beschrieben (95). Sie werden nach einem binären drei bis fünfstelligen Codesystem zu einem biochemischen Code zusammengestellt.

Die Methode der Biochemotypisierung ist als alleinige Differenzierungsmethode nicht ausreichend, aber sehr nützlich zur Subdifferenzierung von Serotypen (64). Sie erlaubt eine feine Diskriminierung der Stämme und liefert nützliche Informationen (13,14,61). So wurden mit Hilfe der Biochemotypisierung das Klonkonzept untermauert und verschiedene Serotypen in mehrere Subtypen differenziert (2).

1.9 Genotypisierende Feindifferenzierungsmethode von *Escherichia coli*

1.9.1 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Während die Serotypisierung und die Biochemotypisierung Methoden der Phänotypisierung sind, kann mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese eine Genotypisierung erfolgen. Durch die molekularbiologische Methode kann von jedem Erreger ein genetischer Fingerabdruck erstellt werden. Damit ergeben sich neue Möglichkeiten der Analyse von Infektketten und der Virulenz der Erreger (30,51,82).

Escherichia coli hat eine Genomgröße von 4,6 bis 4,7 Megabasenpaaren (31,75). Mit selten schneidenden Restriktionsendonukleasen erfolgt das Zerlegen des Bakteriengenoms in 20 bis 60 Fragmente, die dann in der Pulsfeld-Gelelektrophorese nach der Größe separiert werden. Auf diese Weise entstehen überschaubare Fragmentlängenmuster der einzelnen Stämme, welche untereinander verglichen werden können (27,74).

Für die Analyse von *Escherichia coli*-Stämmen hat sich die Restriktionsendonuklease XbaI, die das im *E. coli*-Genom seltene Motiv TCTAGA erkennt, als am besten geeignet erwiesen. XbaI trennt das *E. coli*-Genom in ca. 20 Fragmente mit einer Fragmentgröße von 10 bis 500 kb auf (50,88). Andere Restriktionsenzyme wie z.B. NotI, SfiI und PacI, die eine 8-Basenpaaren-Erkennungssequenz haben, waren vergleichsweise weniger gut geeignet (9).

Zum visuellen Vergleich und Auswertung von Restriktionsmustern werden auf den äußeren und auf der mittleren Gelspur λ -Längenstandards aufgetragen (74). Durch die computergestützte Fragment-Mustererkennung und anschließende Datenverarbeitung können weiterführende Analysen durchgeführt werden, anhand derer die Zusammengehörigkeit der zu vergleichenden Isolate festgestellt wird (12,88). Die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den zu vergleichenden Stämmen können schematisch in Dendrogrammen dargestellt werden.

2 Zielstellung

Eines der Hauptprobleme von Harnwegsinfektionen ist die Gefahr des Übergangs von der einmalig akuten Harnwegsinfektion zu rezidivierenden Harnwegsinfektionen. Durch eine Antibiotikalangzeittherapie im Sinne einer Rezidivprophylaxe kann zwar die Anzahl der Rezidive häufig gemindert werden, jedoch treten die Harnwegsinfektionen nach Absetzen der Therapie schnell wieder auf. Darüber hinaus besteht die Gefahr der Antibiotikaresistenzentwicklung.

Auf der Suche nach Therapiealternativen gibt es verschiedene Ansätze der Immunstimulation. Das Problem dabei ist die Vielzahl der Erreger. Das Präparat Uro-Vaxom® greift diesen Aspekt auf. Uro-Vaxom® ist ein Extrakt aus verschiedenen *E. coli*-Stämmen. Bevor aber die Entscheidung über die Zusammensetzung einer Vakzine gefällt wird, sollte die Fragestellung geklärt werden, ob die klinischen Rezidive auch als bakteriologische Rezidive zu werten sind, oder ob es sich um Reinfektionen durch einen neuen Stamm handelt. Das lässt sich allerdings nur durch eine Feindifferenzierung der Bakterien, die als auslösender Harnwegsinfektionserreger angezüchtet wurden, erreichen.

Unter diesem Aspekt wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universität Rostock in Zusammenarbeit mit der Nephrologischen Abteilung der Klinik für Innere Medizin ein Vakzinierungsmodell auf der Basis einer Autovakzinierung etabliert. Eine streng definierte Patientengruppe – klinisch rezidivierende Harnwegsinfektionen durch *Escherichia coli* hervorgerufen – erhielt eine monovalente *E. coli*-Vakzine aus einem inaktivierten, phänotypisch und genotypisch charakterisierten patienteneigenen Stamm. Folgende Fragen sollten geklärt werden:

1. Welche feindiskriminierenden Methoden sind für die Differenzierung von bakteriologischem Rezidiv oder Reinfektion notwendig?
2. Wie verhielt sich der bakteriologische Befund hinsichtlich der Rezidiv- bzw. der Reinfektionsrate?
3. Führt die Vakzinierung zur Eliminierung des Infektionsstammes?

3 Material und Methoden

3.1 Auswahl der Stämme

Die in dieser Arbeit phäno- und genotypisierten *E. coli*-Stämme stammen von 12 Patienten mit rezidivierenden HWI, die in der nephrologischen Ambulanz der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock im Überwachungsprogramm für Autovakzinierung behandelt und kontrolliert wurden. Die Patienten wurden durch den Kliniker rekrutiert. Voraussetzung für die Autovakzinetherapie war der Nachweis von *E. coli* als ursächlicher Erreger der rezidivierenden HWI. Die Patienten mussten an zwei Harnwegsinfektionen in einem halben Jahr oder an drei Harnwegsinfektionen in einem Jahr erkrankt sein.

HWI, die durch andere Erreger als *E. coli* verursacht wurden, häufiger Erregerwechsel und Mischinfektionen mit mehr als zwei Erregern waren Ausschlusskriterien für die Autovakzinetherapie, da eine monovalente *E. coli*-Vakzine appliziert wurde.

3.1.1 Materialien

Differenzierungsmedien nach Basierkow

Die Herstellung der Medien erfolgte im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universität Rostock

Stammlösung:

1000 ml Aqua dest.
10 g Peptisches Pepton
5 g NaCl
pH-Wert: 7,4

Je 100 ml Stammlösung enthielten 1 g der unten aufgeführten Zucker bzw. Aminosäuren und 0,5 ml einer 0,48 %igen alkoholischen Bromkresolpurpurlösung.

Bromkresolpurpurlösung:

100 ml Ethanol 96 %
0,48 g Bromkresolpurpur

Chemikalien:

Glycerol	: D(+)-Glucose wasserfrei; MERCK, Darmstadt
Laktose	: Laktose-Monohydrat; MERCK, Darmstadt
Saccharose	: Saccharose p.A.; Biochemie Bernd Belger, Klein Machnow
Rhamnose	: L(+)-Rhamnose-Monohydrat; MERCK, Darmstadt
Salicin	: Salicin für die Mikrobiologie; MERCK, Darmstadt
Sorbose	: L(-)-Sorbose; MERCK, Darmstadt
Dulcitol	: Dulcit; MERCK, Darmstadt
Raffinose	: alpha-D-Raffinose; SERVA, Feinbiochemica GmbH & Co KG, Heidelberg
Lysin	: L-Lysine-Monohydrochloride; Roana, Budapest
Ornithin	: L-Ornithine HCL; SERVA, Feinbiochemica GmbH & Co KG, Heidelberg

Lösungen und Reagenzien für die Isolierung chromosomaler DNA:

<u>Nährbouillon I:</u>	Pankreatisches Pepton (Casein)	7,00 g / l
	Pankreatisches Pepton (Fleisch)	5,00 g / l
	Pankreatisches Pepton (Gelantine)	5,00 g / l
	Hefeextrakt	3,00 g / l
	Natriumchlorid	5,00 g / l

<u>SE-Lösung:</u>	75 mM <u>S</u> odium (NaCl)
	25 mM <u>E</u> DTA (pH 7,4, autoklaviert)

<u>ES-Lösung:</u>	0,5 M <u>E</u> DTA (pH 9,5)
	1% N-Lauryl- <u>S</u> arcosin
	0,5 mg / ml Proteinase K
	(Tritirachium album, Boehringer Mannheim GmbH)
	(steril filtriert)

<u>TE-Lösung:</u>	100 mM <u>T</u> ris
	5 mM <u>E</u> DTA (pH 7,4, autoklaviert)

<u>Restriktionspuffer:</u>	50 mM Tris-HCl (pH 7,8)
	10 mM MgCl ₂
	100 mM NaCl

<u>Restriktionsverdauung:</u>	75 µl Restriktionspuffer 1 µl BSA 0,5 µl 0,5M DTT 5 U XbaI (GIBCO BRL)
<u>Ethidiumbromid-Stammlösung:</u>	10 mg / ml H ₂ O dest. (BIO-RAD)
<u>2 % Low-Gelling-Agarose:</u>	(Agarose Typ VII-A: low felling temperature / Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
<u>1 % peq GOLD Universal Agarose</u>	
<u>Standard</u>	(Lambda Ladder PFG Marker / 340, 50µg / ml, New England, Biolabs)
<u>Sonstige Geräte und Materialien:</u>	
Eppendorfgesäßinkubator	
Eppendorfsentrifuge (eppendorf centrifuge 5417R)	
Spekol (Pharmacia LKB, Ultrospec III)	
PFGE-Kammer (CHEF-DR®III System, Bio-Rad)	
Sofortbildkamera (Polaroid MP4)	
Zellsuspensionsblöckchengießform (1 x 10 x 5 mm / Blöckchen, im Haus entworfen und gebaut)	
PFGE-Gelgießform	
Waage (Satorius)	
Flüssigkeitsmesszylinder	
Skalpell	
Brutschrank (37 °C)	
Petrischalen	
Pipetten und Spitzen	
McFarland-Standard	
Reagenzgläser, Reagenzglasständer	
Eppendorfgesäße, -ständer	

3.2 Methoden

3.2.1 Anzucht und Biochemische Identifizierung

Die Keimanzucht erfolgte aus Mittelstrahlurinproben. Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle im Folgenden beschriebenen Kulturen bei 37 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Aus einer 1:100 Verdünnung, hergestellt mit physiologischer Kochsalzlösung, wurden mit einer kalibrierten Öse jeweils 10 µl entnommen, auf Schafblutagar und Galle-Chrysoidin-Glycerol-Agar aufgebracht und 48 Stunden inkubiert (25). Die Ablesung wurde jeweils nach 24 und 48 Stunden vorgenommen. Als signifikante Bakteriurie wurde eine Keimzahl von 10^5 Bakterien pro ml Mittelstrahlurin definiert (60,81). Die bakteriologische Keimidentifizierung wurde mit Hilfe makroskopisch (Koloniefarbe und -größe, Hämolyse u.a.), mikroskopisch (Gram- und Methylenblau-Präparat) und biochemisch feststellbarer Merkmale (bunte Reihe, weitere Kriterien der bakteriologischen Diagnostik) durchgeführt (21). Von jeder Platte wurde ausgehend von einer Einzelkolonie eine Subkultur auf einer Agarplatte (Nähragar I) angelegt. Lagen infolge von zu dichtem Bewuchs keine Einzelkolonien vor, wurde ein Verdünnungsausstrich angefertigt, und ausgehend von diesem eine Einzelkolonie isoliert. Die Subkulturen wurden 18-24 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 2 ml steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung abgeschwemmt. Ausgehend von dieser Bakteriensuspension wurde die O-Typisierung mit Hilfe der Objektträgeragglutination und der Gruber-Reaktion vorgenommen.

Für jedes Isolat wurde ein Resistogramm im Agardiffusionstest erstellt.

3.2.2 Serotypisierung

O-Typisierung

Die O-Typisierung der 172 *E. coli*-Stämme wurde mit Hilfe von 31 monovalenten Antiseren vorgenommen, die durch Immunisierung von Kaninchen mit entsprechenden *E. coli*-Teststämmen aus dem Staatlichen Seruminstitut Kopenhagen hergestellt wurden (24,60). Nach der bei W. Nimmich genau ausgeführten Technik, kamen Antiseren gegen die Gruppenantigene O1–O25, O39, O50, O69, O75, O112a, b und O112a, c zur Anwendung (60).

Zur Serotypisierung wurden alle Antigene zunächst einer orientierenden Vorprüfung unterzogen, die als Objektträgeragglutination mit verschiedenen Poolseren durchgeführt wurde. Folgende Serum-Pools wurden aus gleichen Teilen unverdünnter monovalenter Anti-O-Seren hergestellt:

Pool 1: O1, O3, O4, O5, O9, O21

Pool 2: O2, O8, O14, O15, O23, O24, O112a,b

Pool 3: O6, O7, O10, O11, O17, O18

Pool 4: O12, O16, O19, O25, O39, O69

Pool 5: O13, O20, O22, O75, O83, O112a,c

Nach Verreiben von einem Tropfen des Serum-Pools mit einem Tropfen der Antigensuspension auf einem Objektträger wurde dieser geschwenkt. Das Ergebnis wurde als positiv bewertet, wenn innerhalb von einer Minute eine deutliche Agglutination eintrat.

Kam es mit einem der Poolseren zu einer Agglutination, folgte die Testung des Antigens mit den einzelnen Seren des Poolserums als Objektträgeragglutination. Agglutinierte die Antigensuspension mit verschiedenen Poolseren, waren zur Bestimmung des O-Antigens entsprechend zahlreiche Prüfungen notwendig.

Als Negativkontrolle erfolgte die Testung mit Mischseren, die gegen das jeweilige Antigen keine Reaktivität aufwiesen. Das Vorliegen von Rauformen wurde durch Agglutination in 3,5 %iger NaCl-Lösung erkannt. Zeigte die Antigensuspension mit keinem Antiserum eine Reaktion, so wurde sie zwei Stunden bei 120 °C autoklaviert und anschließend erneut wie beschrieben getestet. Damit wurde eine durch K-Antigene bedingte O-Inagglutinabilität ausgeschlossen.

Zur Bestimmung des O-Antigentiters und Bestätigung der Antigenagglutination wurde die Grubersche Reaktion als Mikrotitrationsmethode durchgeführt.

Die Mikrotitrationsplatte hat 12 Vertiefungen. In die erste Vertiefung wurden 100 µl einer 1:100 Antiserum-Verdünnung vorgelegt. In die zweite bis zwölfte Vertiefung wurden 50 µl PBS vorgelegt. Nun wurden ausgehend von der ersten Vertiefung immer 50 µl Antiserum mit einer Pipette abgezogen und in die nachfolgende Vertiefung bis einschließlich der elften Vertiefung pipettiert, so dass eine geometrische Serumverdünnungsreihe hergestellt wurde. In der zwölften Vertiefung verblieben die 50 µl PBS ohne Antiserum. Nun wurden in alle Vertiefungen 50 µl einer Suspension mit 5×10^8 Bakterien pipettiert. Die Platte wurde geschwenkt und bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Nach 18-24 Stunden wurde abgelesen. Dabei entsprachen ein Punkt aus sedimentierten Bakterien am Boden der Vertiefung einer negativen Reaktion und eine Häutchenbildung einer positiven Reaktion im Sinne einer Agglutination der Bakterien. Die letzte Vertiefung mit positiver Reaktion entsprach der Titerstufe des Serums für den zu testenden Stamm.

Vom Referenzstamm wurde in gleicher Weise eine Verdünnungsreihe hergestellt und der O-Titer bestimmt. Der Nachweis des gleichen Gruppenantigens war dann erbracht, wenn der Titer des Stammes aus der Urinprobe nicht mehr als eine Titerstufe vom Titer des Referenzstammes abwich.

Alle Stämme, die auf diese Weise nicht zu typisieren waren, wurden als nicht typisierbar bezeichnet (21,60).

H-Typisierung

Bei allen beweglichen Stämmen wurde eine H-Typisierung vorgenommen. Es erfolgte zunächst eine dreimalige U-Röhrchenpassage in halbfesten Nährmedien, um die Ausbildung der H-Antigene zu optimieren. Es kamen 53 absorbierte monospezifische anti-H-Seren, gewonnen durch Immunisierung von Kaninchen mit Formalin inaktivierten *E. coli* H-Referenzstämmen, zur Anwendung. Nach Suchreaktionen mit 7 verschiedenen Serum-Pools wurde mit entsprechenden monospezifischen Testseren die Objektträgeragglutination durchgeführt (64,71).

K-Typisierung

Eine mit einer Kolonie beimpfte Nährbouillon I wurde zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend über eine Lysotypieplatte mit Nähragar I geschwemmt. Bouillonreste wurden abpipettiert, die Lysotypieplatte bei Raumtemperatur getrocknet und die K-Phagen mittels Glasstäbchen aufgebracht. Es folgte eine fünfstündige Inkubation bei 37 °C. Positive Stämme wurden am ausbleibenden Wachstum im Bereich des Phagen erkannt, während negative Stämme ein durchgehendes Wachstum zeigten. Es wurden Bakteriophagen folgender K-Antigene eingesetzt: K1, K2, K3, K5, K6, K7, K9, K12, K13, K20, K100 (64,67).

3.2.3 Hämagglutination

Zur Erfassung der Expression von Fimbrien wurde die Fähigkeit der Stämme zur Hämagglutination von humanen Erythrozyten der Gruppe A, sowie von Meerschweinchen- und Rattenerythrozyten geprüft. Dazu wurde ein Tropfen einer Bakteriensuspension aus einer 24-Stunden-Kultur in „Pili-Bouillon“ mit einer 3 %igen Suspension der jeweiligen Erythrozyten in isotonischer Kochsalzlösung mit und ohne Zusatz von 2,5 % Mannose gemischt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei 37 °C wurde die Hämagglutination makroskopisch beurteilt (84).

3.3 Charakterisierung der klonalen Identität

3.3.1 Biochemotypisierung

Alle Stämme wurden einer Biochemotypisierung unterzogen. Der biochemische Code ergab sich aus den Ergebnissen der Fermentation von zehn Zuckern und zwei Aminosäuren sowie des Hämolyisin- und Indolnachweises. Die Fermentation der Zucker erfolgte in den Differenzierungsmedien nach Basierkow mit Bromkresolpurpurlösung a 2 ml. Nach dreimaliger Passagierung der Bakterienstämme über Nähragar I-Platten wurde mit 0,9 %iger Kochsalzlösung durch den Vergleich der optischen Dichte mit einem McFarland-Standard eine Bakteriensuspension mit 3×10^8 Zellen hergestellt. Diese Suspension wurde 1:100 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Mit jeweils einem Tropfen dieser Verdünnung wurden die Nährmedien beimpft, die nun bei 37 °C über 72 Stunden inkubiert wurden. Zum Ausschluss falsch negativer Ergebnisse wurden passende Kontrollstämme mitgeführt.

Aufgrund der Serovar wurden Vermutungen über identische, ähnliche und differente Stämme angestellt und daraus Schlussfolgerungen über den zu erwartenden biochemischen Code gezogen. Wichen Ergebnisse von zu erwartenden fermentativen Eigenschaften eines Stammes ab, so wurde für alle vermutlich identischen oder ähnlichen Stämme die betreffenden Reaktionen wiederholt um technische Ursachen auszuschließen. Dabei zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit der Testergebnisse.

Hämolyisinnachweis

Alle *E. coli*-Stämme wurden auf Hämolyisinbildung getestet. Die Erreger wurden auf Nähragarplatten abgeimpft, denen fünf Prozent Schafblut zugesetzt war, und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde eine deutliche Hämolysezone über den Kolonierand hinaus als positive Reaktion gewertet und als Hämolyisin + (positiv) gekennzeichnet. War kein hämolysierter Bereich zu erkennen, wurden die Stämme als Hämolyisin - (negativ) bezeichnet (94).

Fermentation der Zucker

Zur Erstellung des biochemischen Codes wurden alle Stämme auf die Fermentation von Glycerol, Laktose, Raffinose, Saccharose, Rhamnose, Dulcitol, Sorbose und Salicin getestet. Nach 72 Stunden wurde abgelesen. Dabei entsprach ein Farbumschlag von lila zu gelb einem positiven Testergebnis.

Fermentation der Aminosäuren

Weiterhin wurde die Fermentation der Aminosäuren Lysin und Ornithin getestet. Das Ergebnis konnte nach 72 Stunden abgelesen werden, wobei ein Farbumschlag der Medien von gelb zu lila einem positiven Testergebnis entsprach.

Indolnachweis

Der Indolnachweis wurde in einer beimpften, über 24 Stunden bei 37 °C inkubierten Tryptophan-Bouillon mit Kovács-Reagenz durchgeführt. Dabei wurde die Reaktion als positiv gewertet, wenn es innerhalb von fünf Minuten zur Bildung eines rot-violetten Ringes an der Berührungsfläche beider Flüssigkeiten kam.

3.3.2 Biochemischer Code

Der vierstellige biochemische Code setzt sich aus den Ergebnissen der in vier Codetriplets eingeteilten Nährmedien (Tests) zusammen. Dabei wird jeder positiven Reaktion ein bestimmter Zahlenwert zugeordnet. Negative Reaktionen werden mit Null bewertet. Die nähere Erläuterung erfolgt an dem Beispiel des Stammes 973 (O n.t. : H⁺ : K n.t.) der Patientin 1 mit dem biochemischen Code 3705 in **Tab. 1**.

Tab. 1: Beispiel für die Erstellung des biochemischen Codes anhand des Isolates 973 der Patientin 1

Zahlenwert	4	2	1		4	2	1		4	2	1		4	2	1
Reaktion	Hämolyisin	Glycerol	Laktose		Lysin	Indol	Ornithin		Raffinose	Saccharose	Rhamnose		Dulcitol	Sorbose	Salicin
Ergebnis	-	+	+		+	+	+		-	-	-		+	-	+
Ergebnisbewertung	0	2	1		4	2	1		0	0	0		4	0	1
Biochemischer Code		3				7				0				5	

3.3.3 Genotypisierung mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese

Als weitere Methode der Feintypisierung der *E. coli*-Stämme kam die Pulsfeld-Gelelektrophorese zur Anwendung.

Erregeranzucht

Die Erreger wurden von der schon für die Biochemotypisierung genutzten Agarplatte in 4 ml Standard I-Nährbouillon abgeimpft und über 24 Stunden inkubiert. Die Kultur wurde bei 4000 U/ min zehn Minuten zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zweimal mit dem gleichen Volumen SE-Lösung gewaschen. Im Anschluss wurde das Sediment in 0,5 ml SE-Lösung resuspendiert und 1 ml einer 1:100 Verdünnung hergestellt. Nach Bestimmung der Zelldichte wurde diese Suspension für die Präparation der Agaroseblöckchen genutzt.

Bestimmung der Zellkonzentration

Um die gewünschte Zellkonzentration von 5×10^9 Zellen / ml (entspricht 3 OD₆₀₀, OD = Optische Dichte) zu erhalten, wurde die Extinktion der 1:100 verdünnten Suspension bei 600 nm bestimmt. Dabei wird die Schwächung der Strahlung aufgrund von Absorption, Streuung, Beugung und Reflexion beim Durchgang durch ein Medium gemessen. Der Anteil der durchgelassenen Strahlung ist der Transmissionsgrad und ist wellenlängenabhängig.

Es war bekannt, dass $0,6 \text{ OD}_{600} = 1 \times 10^9$ Zellen entsprechen. Nach der Berechnung der Verdünnungsfaktoren wurde die Sollwertbakteriensuspension in einem Volumen von 500 µl hergestellt.

Präparation der in Agarose eingeschlossenen DNA

Für die Herstellung der Agaroseblöckchen wurde die korrekt konzentrierte Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Agarose mit niedriger Geliertemperatur gemischt. Auf diese Weise werden Strangbrüche der genomischen DNA-Fragmente durch mechanische Scherkräfte vermieden (94). Das Gemisch wurde luftblasenfrei in die dafür vorgesehenen Gießkammern pipettiert.

Nach dem Erkalten der Agarose (ca. 30 Minuten bei 4 °C) wurden die Blöckchen in die mit 800 µl ES-Lösung und 10 µl Proteinase K 50 %ig vorbereiteten Eppendorfgefäße aufgenommen, die bei 56 °C über Nacht inkubiert wurden.

Zum Stoppen der Proteinasereaktion wurde die ES-Lösung durch TE-Lösung ersetzt.

Aufspaltung der DNA durch das Restriktionsenzym XbaI

Von den Blöckchen wurde ein Streifen in der Größe der Gellade vorsichtig mit dem Skalpell auf einer glatten, sauberen Unterlage (Petrischale) abgetrennt. Zum Herauswaschen des EDTA-Reagenz wurden die Proben dreimalig mit Restriktionspuffer für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Im letzten Arbeitsgang wurde der Puffer gegen die Restriktionsverdaulösung gewechselt, die das Restriktionsenzym XbaI enthielt. Die so aufgearbeiteten Proben wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Gelelektrophorese

Zur Herstellung des Gels wurde die Gel-Gieß-Kammer genutzt und auf der ebenen Oberfläche das Gel gegossen. Zur Präparation der Gelladen wurde in das noch flüssige Gel ein spezieller Kamm eingesetzt. Für die Elektrophorese war es wichtig, dass eine schmale Fläche Gel von ca. 2 mm zwischen Kammende und Gießkammergrund erhalten bleibt, so dass die Proben keinen Kontakt mit der Platte hatten.

Es wurde unter Erhitzen eine 1,5 %ige Gelflüssigkeit aus 180 ml 0,5 x TBE und 2,7 g Agarose hergestellt und auf die Plattform gegossen. Nachdem das Gel erstarrt war, konnte der Kamm aus seiner Halterung entfernt werden.

In Vorbereitung der Gelelektrophorese wurden ca. 3 l des Elektrophoresepuffers (0,5 x TBE) in die Elektrophoresekammer gegeben und die Kühleinheit gestartet, damit der Puffer auf die nötige Temperatur von 10 °C abkühlen konnte.

Jede Probe wurde vorsichtig in eine Geltasche des 1,5 %igen Agarosegels gegeben. Es erfolgte der Verschluss der Gelladen mit der restlichen Agarose zur Fixierung der DNA-Blöcke. Als Kontrolle wurde der Längenstandard λ mit bekanntem Basengewicht mitgeführt, um in der Auswertung einen genau definierten Bezug zu haben. Die fertig vorbereitete Gelplatte wurde in der Elektrophoresekammer positioniert. Der Gellauf wurde in der mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer (CHEF-DR®III System, Bio-Rad) nach Aquilibrierung gestartet.

Die Wechselfeld-Gelelektrophorese lief bei einer Temperatur von 10 °C, einer Stromstärke von 174 mA und bei einer Spannung von 6,1 V / cm. Die DNA-Fragmente wurden in dem homogenen elektrischen Feld, welches zwischen zwei Orientierungen im Winkel von 120 ° wechselte, separiert.

Versuchsbedingungen:

Kürzester Puls: 5 /5

Längster Puls: 30 /50

Anzahl der Ramps: 2

Pulszeitänderung: linear

Ramp Periode: 18

Spannung: 6,1 V/cm

Strom: 174 mA

Kühltemperatur: 10 °C

Puffer: 0,5 x TBE

Winkel: 120 °

Agarosekonzentration: 1,5 %

Restriktionsenzym: XbaI

Die Fragmente wurden anschließend durch Färbung in einem Ethidiumbromidwasserbad gefärbt und somit unter UV-Licht sichtbar. Zum Färben verblieb das Gel für etwa 10 bis 15 Minuten in dieser Lösung. Vor der Beobachtung und fotografischen Dokumentation der Fragmentmuster unter einem UV-Transilluminator wurde die Gelplatte in einem Behälter mit destilliertem Wasser gespült.

Auswertungskriterien der Restriktionsmuster

Nach Römling, Tenover und Pfaller reicht der visuelle Vergleich der Makrorestriktionsfragmentlängenmuster der Stämme aus, sofern diese auf einem einzigen Gel analysiert werden können (69,74,88). Da uns das nicht immer möglich war, wurden sorgfältige Kontrollen notwendig. So wurden auf jedem Gel drei Längsstandards (λ -Concatamere) auf der mittleren und den beiden äußeren Spuren aufgetragen, anhand derer der visuelle Vergleich verschiedener Gele möglich wurde.

Die Auswertung der Restriktionsmuster erfolgte nach den Kriterien von Pfaller, der *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa* mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese untersuchte. Diese sind eine modifizierte Form der Auswertungskriterien nach Tenover, die als etablierter Standard gelten. Sie sind aber nur an kleineren Populationen, die über einen Zeitraum von weniger als einem Jahr gesammelt wurden, untersucht worden (69,88).

Um Stämme als identisch zu bezeichnen, müssen alle Banden genau übereinstimmen. Solche Muster wurden mit einem Großbuchstaben bezeichnet. Stämme, die in über 90 % aber in

weniger als 100 % der Banden übereinstimmen, wurden als "ähnlich" betrachtet und als Subtypen oder auch klonale Varianten durch eine Zahl nach dem Großbuchstaben ausgewiesen. Das bedeutet, es lag eine Differenz von ein bis drei Banden vor. War die Übereinstimmung der Banden geringer als 90 %, also wichen Stämme in mehr als drei Banden voneinander ab, so wurden sie als "verschieden" betrachtet und durch einen anderen Großbuchstaben gekennzeichnet (69).

3.4 Herstellung der Autovakzine

Wenn bei einem Patienten zweimal nacheinander serotypisch und biochemotypisch der gleiche Stamm nachweisbar war, erfolgte die Herstellung und Applikation einer Autovakzine. Zur Herstellung der Vollkeimvakzine wurden 4 Nähragar-I-Platten beimpft und 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Anschließend erfolgte das Abschwemmen mit 5 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung pro Platte und das Zentrifugieren bei 4000 U/min über 10 min. Das Sediment wurde erneut in 20 ml NaCl-Lösung aufgenommen. Nach nochmaliger Resuspension in 20 ml Phenol (0,5 %) und NaCl-Lösung (0,9 %) wurde das Röhrchen nach Zugabe von 0,2 ml 30 %iger Formaldehyd-Lösung fest verschlossen und zur Abtötung der Keime 72 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Sterilitätsprüfung erfolgte das Abimpfen von 0,1 ml der Suspension auf jeweils eine Blut- und Grünagarplatte sowie in eine Nährbouillon I und Thioglykolatbouillon. Die Vakzine galt als steril, wenn nach dreitägiger Inkubation bei 37 °C keine Keimvermehrung stattgefunden hatte.

Die Suspension wurde zwei Mal mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und das Sediment auf 20 ml mit 0,9 %iger NaCl-Lösung aufgefüllt. Die Keimdichte wurde auf 8×10^8 Keime / ml mittels Vergleich zu einem McFarland-Standard eingestellt. Weiterhin erfolgte die Bestimmung der Phenol- und Formaldehydkonzentration, die den Grenzwert von $\leq 0,5 \text{ g} / 100 \text{ ml}$ nicht überschreiten durfte. Zur Verträglichkeitskontrolle wurden im Tierversuch fünf Mäusen 0,5 ml der Vakzine s.c. appliziert.

Die Autovakzine wurde in der Apotheke steril abgefüllt und war danach bei einer Lagerung von + 2 bis + 5 °C über sechs Monate verwendungsfähig.

3.4.1 *Impf- und Dosierungsschema*

Innerhalb des Überwachungsprogramms für die Autovakzinierung wurden im Rahmen der Vorfelduntersuchungen Patienten selektiert, die ausschließlich unter durch *E. coli* hervorgerufenen Harnwegsinfektionen litten. Voraussetzung für die Teilnahme am Autovakzineprogramm war die zweimalige Keimanzucht identischer Erreger bei zwei direkt aufeinander folgenden HWI-Episoden.

Die Autovakzinierung wurde drei bis vier Wochen nach einer erfolgreichen Antibiotikatherapie einer akuten Infektion begonnen. Am Anfang der Studie erfolgte eine dreimalige i.m. Applikation von jeweils 0,5 ml der abgetöteten Vollkeimvakzine im Abstand von einer Woche. Ab ca. 1990 wurden sechs Applikationen im wöchentlichen Abstand unter Dosissteigerung von 0,5 ml bis 1,0 ml durchgeführt. Bei lokalen (Erythem, Induration, Schmerzen an Einstichstelle) und / oder allgemeinen (Fieber) Unverträglichkeitsreaktionen der Patienten wurden die Impftermine verschoben und die Applikation erst nach Abklingen aller Symptome fortgesetzt.

Innerhalb des Protokolls wurden vor jeder Applikation, sowie 14 Tage nach Abschluss der Vakzinierung und dann alle acht Wochen 24-Stunden-Sammelurin, Mittelstrahlurin und Blut ohne Zusätze zur Serumgewinnung abgenommen. Bei Rezidiven außerhalb der Kontrolltermine wurden Mittelstrahlurin und Blut ohne Zusätze abgenommen.

4 Ergebnisse

In das Überwachungsprogramm für Autovakzinierung wurden 12 Patienten der nephrologischen Ambulanz der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock einbezogen, die sich wegen rezidivierender Harnwegsinfektionen, hervorgerufen durch *Escherichia coli*, in Behandlung befanden.

Die Untersuchungen wurden in der Zeit von Juni 1988 bis Januar 1997, was einem Untersuchungszeitraum von insgesamt acht Jahren und sieben Monaten entspricht, durchgeführt. Die Patienten wurden durchschnittlich über vier Jahre und sechs Monate beobachtet, wobei sich der kürzeste Beobachtungszeitraum über neun Monate (Patient 5) und der längste Beobachtungszeitraum über acht Jahre und zwei Monate (Patient 11) erstreckte (Tab. 2).

Im untersuchten Kollektiv befanden sich 11 Frauen und ein Mann. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 52 Jahre, wobei die jüngste Patientin im Alter von 33 Jahren und die Älteste im Alter von 70 Jahren bei Beobachtungsbeginn war. Nach Einsichtnahme in die Patientenakten litten neun Patienten unter einer chronisch rezidivierenden Pyelonephritis (chron. rezid. PN) und zwei Patienten unter Zystitiden. Bei Patient 6 fand sich nur der Begriff der rezidivierenden Harnwegsinfekte ohne weitere Konkretisierung.

Tab. 2: Beobachtungszeiträume, Diagnosen und wesentliche Nebenerkrankungen der im Rahmen dieser Arbeit behandelten Patienten

Patient	Beobachtungszeitraum		Diagnose	Wesentliche Nebenerkrankungen
	Von...bis...	In Jahren		
1 ♀	4/92 – 11/95	3 Jahre 8 Monate	Chron. Rez. PN	Keine
2 ♀	2/89 – 5/93	4 Jahre 3 Monate	Chron. Rez. PN	Ureter fissus li, Ureter duplex re
3 ♀	10/91 – 1/97	5 Jahre 3 Monate	Chron. Rez. PN	Nephrektomie re bei Nephrolithiasis
4 ♀	12/91 – 7/93	1 Jahr 7 Monate	Rez. Zystitiden	Ren mobile re
5 ♀	10/91 – 7/92	9 Monate	Chron. Rez. PN	Keine
6 ♀	3/92 – 2/94	1 Jahr 11 Monate	Rez. HWI	Fokal sklerosierende GN, chron. Niereninsuffizienz
7 ♀	3/89 – 11/93	4 Jahre 8 Monate	Chron. Rez. PN	Keine
8 ♀	8/94 – 12/96	2 Jahre 4 Monate	Chron. Rez. PN	Vesikoureteraler Reflux
9 ♀	9/89 – 1/96	6 Jahre 4 Monate	Chron. Rez. PN	Keine
10 ♀	1/89 – 5/96	7 Jahre 3 Monate	Chron. Rez. PN	Keine
11 ♀	6/88 – 8/96	8 Jahre 2 Monate	Chron. Zystitis	Keine
12 ♂	10/88 – 8/96	7 Jahre 10 Monate	Chron. Rez. PN	Keine

Die Anzahl der zu vergleichenden Stämme innerhalb der einzelnen Patienten variierte dabei. Bei Patient 11 mit dem längsten Beobachtungszeitraum von acht Jahren und zwei Monaten wurden mit 52 Stämmen die meisten Isolate angezüchtet. Elf bis 25 *Escherichia coli*-Stämme konnten bei den Patienten 1, 7, 8 und 9 isoliert werden. Bei den verbleibenden Patienten 2, 3, 4, 5, 6, 10 und 12 wurden vier bis zehn *Escherichia coli*-Stämme angezüchtet (Tab. 3).

Bei den 12 Patienten wurden 162 Episoden von Harnwegsinfektionen registriert bei denen 173 *Escherichia coli*-Stämme aus Mittelstrahlurinen angezüchtet wurden. Der Stamm 9172 der Patientin 11 stand den feintypisierenden Methoden nicht mehr zur Verfügung. Somit wurden 172 Stämme weiterführend untersucht. Bei zehn HWI-Episoden wurden jeweils zwei verschiedene *E. coli*-Stämme isoliert, die mit den feintypisierenden Methoden weiter untersucht wurden. Somit ergibt sich eine um 10 höher liegende Anzahl an *E. coli*-Isolaten als HWI-Episoden (Tab. 3).

Tab. 3: Anzahl der phäno- und genotypisierten *E. coli*-Stämme und HWI-Episoden pro Patient

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Gesamt
Anzahl der Isolate	14	10	9	8	6	4	25	15	11	10	52	8	172
Anzahl der HWI-Episoden	14	9	9	8	6	4	23	15	11	10	45	8	162

Nachdem ein *E. coli*-Stamm bei einem Patienten in mindestens zwei aufeinander folgenden HWI als identisch identifiziert worden war, wurde aus selbigem die Autovakzine hergestellt. Die Patienten erhielten nach vorgegebenem Schema die i.m. Applikation der Autovakzine. Vor jeder Vakzinierung und 14 Tage nach abgeschlossener Vakzinierung im achtwöchentlichen Abstand erfolgte die Untersuchung von Mittelstrahlurin. Traten außerhalb der Kontrolltermine klinische Rezidive auf, so wurde der Mittelstrahlurin untersucht und Blut zur Bestimmung der Entzündungsparameter entnommen. Ggf. erfolgte die Einleitung einer antibiotischen Therapie.

Alle Stämme wurden nach den in Material und Methoden beschriebenen Verfahrensweisen serotypisiert, biochemotypisiert und durch eine Fragmentmusteranalyse mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese genotypisiert. Nach der Serotypisierung konnten 96 Stämme (56 %) O-typisiert werden, 46 Stämme (27 %) waren nicht typisierbar und 30 Stämme (17 %) lagen als Rauhformen vor (Abb. 1).

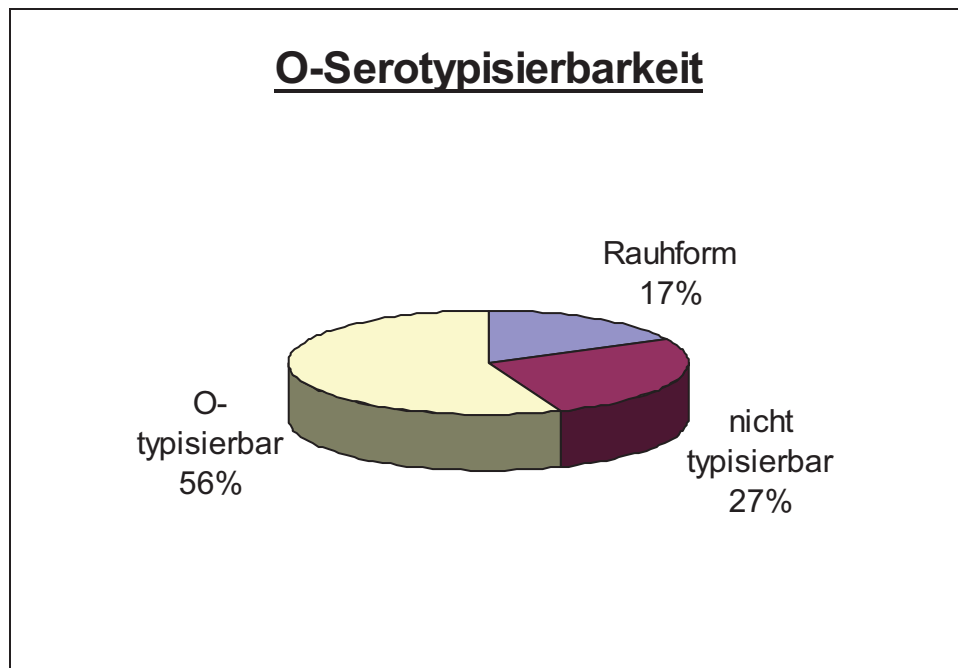


Abb. 1: O-Serotypisierbarkeit der untersuchten Stämme aller Patienten

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Patienten im Einzelnen besprochen. Besonderes Augenmerk gilt dem Vergleich von Sero- und Biochemotyp. Jedem Patienten sind eine Übersicht über die Vakzinetherapie und eine Tabelle mit den Vakzinierungsdaten, den Sero-, Biochemo- und Genotypen zugeordnet. Zur besseren Übersicht sind der Vakzinestamm und die Applikationsdaten in der Tabelle rot unterlegt. Es wurde jede Urinkontrolluntersuchung, die laut Protokoll vorgesehen war, mit aufgeführt. Den ins Labor eingegangenen Urinproben wurden fortlaufende Stammenummern zugeteilt, unabhängig davon, ob die Proben innerhalb der Studie weiter bearbeitet wurden oder zur Routinediagnostik gehörten. Stammenummern ohne angegebene Keimzahl, Sero-, Biochemo- und Genotyp waren sterile Urinkontrollen. Für die Ergebnissauswertung wurden lediglich die angezüchteten Stämme gezählt, nicht die Anzahl der eingegangenen Urinproben. Daraus resultiert die Diskrepanz zwischen der im Text beschriebenen Stammanzahl und in der Tabelle aufgeführten Anzahl von Stammenummern. Für die Auswertung ist diese Darstellung

dennoch wichtig, da sowohl krankheitsfreie Intervalle mit sterilen Urinkulturen als auch die Krankheitsverläufe während der Vakzinierungen besser ersichtlich werden.

In einer weiteren Tabelle sind die einzelnen Testergebnisse für die Biochemotypen der Stämme zusammen mit den Sero- und Genotypen abgebildet. Reaktionsergebnisse, die zu geringen Abweichungen im biochemischen Code führen, sind farblich hervorgehoben. Weiterhin ist jedem Patienten eine Abbildung der Restriktionsmuster der Stämme zugeordnet. Da nicht alle Restriktionsmuster im ersten Ansatz einer Pulsfeld-Gelelektrophorese auswertbar waren, wurden zur besseren Darstellung die Abbildungen mehrerer Gele kombiniert. Der verwendete Fragmentgrößen-Standard war immer gleich, so dass die Restriktionsmuster anhand dieses Standards visuell vergleichbar waren.

Patientin 1

Patientin 1, weiblich, 58 Jahre bei Beobachtungsbeginn, wurde bereits seit 1987 wegen einer chronisch rezidivierenden Pyelonephritis in der nephrologischen Ambulanz der Inneren Medizin der Universität Rostock behandelt. Der Beobachtungszeitraum, in welchem 14 *E. coli*-Stämme isoliert wurden, erstreckte sich über drei Jahre und acht Monate.

4.1.1 Vakzinierung

Die Patientin wurde in dem Beobachtungszeitraum einer Vakzinetherapie unterzogen. Die Vakzinierungsdaten sind in Tab. 4 zusammengestellt.

Tab. 4: Übersicht der Vakzinetherapie der Patientin 1

	Anzahl der Applikationen	Vakzinestammnr.	Vakzineserotyp	Biochemotyp	Genotyp	Vakzinierungszeitraum
1. Vakzinierung	6	973	O n.t. : H+ : K n.t.	3705	A1	06.07.1992 – 10.08.1992

Legende: n.t.: nicht typisierbar; H+: beweglicher Stamm

Die Vakzinierung wurde mit dem beweglichen Stamm 973 durchgeführt, bei dem weder das O- noch das K-Antigen typisierbar waren. Der Stamm wurde durch den Biochemotyp 3705 charakterisiert und gehörte zum Genotyp A1. Die Patientin erhielt sechs Applikationen im wöchentlichen Abstand. Der Vakzinierungszeitraum ist der Tab. 4 zu entnehmen.

4.1.2 Bakterienstammcharakterisierung

In der Beobachtungszeit wurden 14 Stämme isoliert (Tab. 5). Bei einem Stamm (Nr.1015) war das O14-Antigen und bei einem Stamm (Nr.1184) war das O75-Antigen zu ermitteln, während alle anderen Stämme durch ein nicht typisierbares O-Antigen gekennzeichnet waren. Außer zwei nicht begeißelten Stämmen (Nr.982 und 1184), waren die verbliebenen Stämme beweglich. Bei der überwiegenden Zahl der Stämme war das Kapselantigen nicht typisierbar. Unter den Stämmen mit typisierbarem K-Antigen konnten zwei Mal das K5-Antigen (Nr.1203 und 1205), und jeweils ein Mal das K7- (Nr.1253), das K30- (Nr.1033) und das K100-Antigen (Nr.1184) nachgewiesen werden.

Tab. 5: Probenahmedaten, Serovare, Biochemotypen und Genotypen der *E. coli*-Isolate der Patientin 1

Stamnummer	Probeneingangsdatum	Keimzahl /ml Urinprobe	Serovare	Biochemotypen	Genotypen
973	01.04.1992	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	3705	A1
982	21.04.1992	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	3714	A2
1012	06.07.1992	steril			
1015	13.07.1992	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	3611	B1
1021	21.07.1992	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	3611	B2
1022	27.07.1992	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	3611	B2
1025	03.08.1992	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	3611	B1
1029	10.08.1992	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	3611	B3
1033	27.08.1992	>10 ⁵	O n.t. H+ K 30	3611	B2
1048	08.10.1992	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	3611	B4
1184	06.05.1994	>10 ⁵	O 75 H- K 100	3730	C
1203	27.09.1994	~10 ⁵	O n.t. H+ K 5	3776	D1
1205	04.10.1994	>10 ⁵	O n.t. H+ K 5	3756	D2
1253	12.04.1995	>10 ⁵	O n.t. H+ K 7	3614	E
1273	25.07.1995	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	3654	F
1299	22.11.1995	steril			

Legende: n.t.: nicht typisierbar; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm

Aus dem Stamm 973 wurde die Autovakzine hergestellt und sechs Mal appliziert (Tab. 5 rot unterlegt).

Durch die Biochemotypisierung wurden acht Typen ermittelt. Sieben Stämme (Nr.1015 bis 1048), welche unter und nach der Vakzinierung isoliert wurden, waren durch den identischen Biochemotyp 3611 charakterisiert. Die anderen Stämme wiesen biochemotypisch Ähnlichkeiten auf. Insbesondere der Vakzinestamm (Nr.973) und die Stämme 982 und 1253 unterschieden sich nur in den wechselnden Fermentationsfähigkeiten für Rhamnose und Salicin (Biochemotyp 3705 bzw. 3714) (Tab. 6). Der Stamm 1253 mit dem K7-Antigen konnte zusätzlich kein Ornithin abbauen (Biochemotyp 3614).

Die zwei weiteren Stämme 1203 und 1205, bei denen das K5-Antigen typisiert werden konnte, waren durch die fast identischen Biochemotypen 3776 bzw. 3756 charakterisiert. Sie unterschieden sich nur im Fermentationsvermögen von Saccharose (Tab. 6).

Tab. 6: Biochemotypisierungsergebnisse zu den *E. coli*-Isolaten der Patientin 1

Stammnummer	Isolierungsdatum	Keimzahl /ml Urinprobe	Serovare	Hämolysebildung	Fermentation von											Biochemotypen	Genotypen
					Glycerol	Laktose	Lysin	Indol	Ornithin	Raffinose	Saccharose	Rhamnose	Dulcitol	Sorbitose	Salicin		
973	01.04.1992	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	3705	A1
982	21.04.1992	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	3714	A2
1015	13.07.1992	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	3611	B1
1021	21.07.1992	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	3611	B2
1022	27.07.1992	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	3611	B2
1025	03.08.1992	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	3611	B1
1029	10.08.1992	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	3611	B3
1033	27.08.1992	>10 ⁵	O n.t. H+ K 30	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	3611	B2
1048	08.10.1992	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	3611	B4
1184	06.05.1994	>10 ⁵	O 75 H- K 100	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	3730	C
1203	27.09.1994	~10 ⁵	O n.t. H+ K 5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	3776	D1
1205	04.10.1994	>10 ⁵	O n.t. H+ K 5	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	3756	D2
1253	12.04.1995	>10 ⁵	O n.t. H+ K 7	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	3614	E
1273	25.07.1995	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	3654	F
Codetriplets					4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	

Legende: n.t.: nicht typisierbar; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm
 (+) positive Reaktion – im Codetriplett mit 1, 2 bzw. 4 bewertet
 (-) negative Reaktion – im Codetriplett mit 0 bewertet
 Farbunterlegung: abweichende Reaktionen, die zu geringfügigen Änderungen des biochemischen Codes führen
 Codetriplets: additive Werte der positiven Reaktionen pro Triplett ergeben den biochemischen Code

Die anderen Stämme wiesen gewisse Ähnlichkeiten auf, waren aber nicht genau zuzuordnen.

Nach Auswertung der Restriktionsmuster konnten bei den 14 Stämmen sechs verschiedene Genotypen A bis F unterschieden werden (Abb. 2).

Zwei Stämme (Nr.973 und 982) wurden dem Genotyp A zugeordnet, der aufgrund der Differenz zweier Fragmente in die Subtypen A1 und A2 unterteilt wurde. Die Stämme (Nr.1015 bis 1048) mit identischem Biochemotyp wurden auch einem Genotyp (B) zugeordnet, der aufgrund von Abweichungen von bis zu drei Banden in die Subtypen B1 bis B4 unterteilt wurde. Zwei weitere Stämme (Nr.1203 und 1205) waren dem Genotyp D zugehörig. Wie im Biochemotyp (3776 bzw. 3756) lagen auch in den Restriktionsmustern beider Stämme geringe Unterschiede vor. Aufgrund der Differenz eines Fragmentes wurde der Genotyp in D1 und D2 unterteilt.

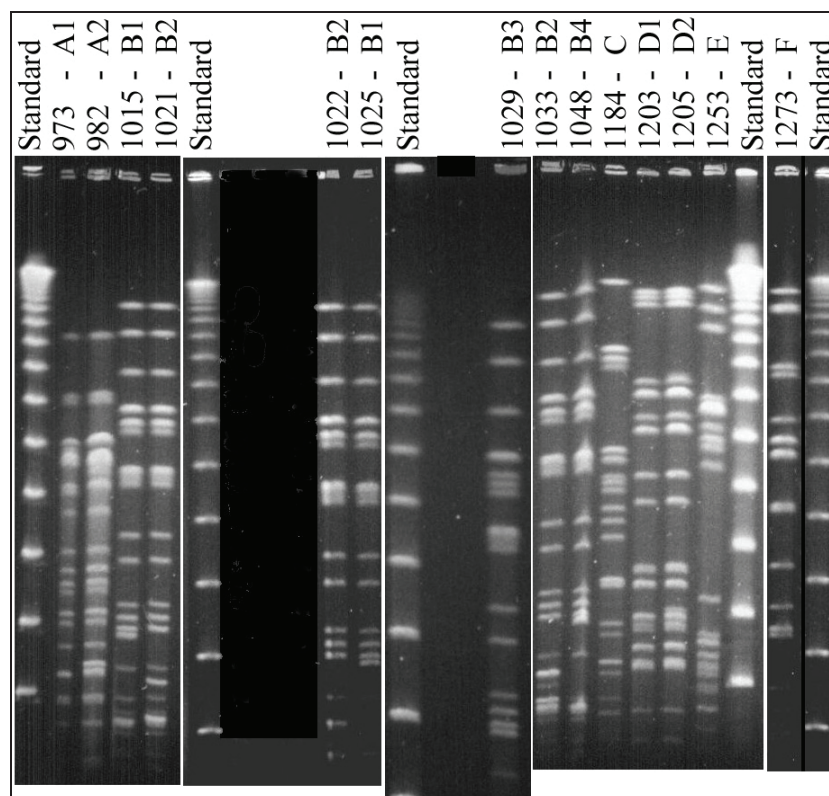


Abb. 2: Restriktionsmuster der genomischen DNA der *E. coli*-Stämme der Patientin 1 nach XbaI-Verdau und Auftrennung der Fragmente mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese

4.2 Patientin 2

Bei Patientin 2, weiblich, 38 Jahre bei Beobachtungsbeginn, wurde 1974 erstmals eine Bakteriurie während der Schwangerschaft nachgewiesen. Es entwickelte sich eine chronisch rezidivierende Pyelonephritis bei einem Ureter fissus links und einem Ureter duplex rechts. Seit 1977 wurde die Patientin in der nephrologischen Ambulanz der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock behandelt. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über vier Jahre und drei Monate.

4.2.1 Vakzinierung

Die Patientin wurde im Beobachtungszeitraum einmal mit einer nicht typisierbaren O-Serovar (Nr. 626) vakziniert. Die Vakzinierungsdaten sind in Tab. 7 beschrieben.

Tab. 7: Übersicht der Vakzinetherapie der Patientin 2

	Anzahl der Applikationen	Vakzinestammnr.	Vakzineserotyp	Biochemotyp	Genotyp	Vakzinierungszeitraum
1. Vakzinierung	3	626	O n.t. : H31 : K n.t.	3716	A	18.04.1989 – 02.05.1989

Legende: n.t.: nicht typisierbar

Die Patientin erhielt bei der Vakzinierung drei Applikationen im wöchentlichen Abstand. Der Vakzinestamm war durch den Biochemotyp 3716 charakterisiert und gehörte zum Genotyp A. Der Vakzinierungszeitraum ist der Tab. 7 zu entnehmen.

4.2.2 Bakterienstammcharakterisierung

Im Beobachtungszeitraum wurden zehn *E. coli*-Stämme isoliert (Tab. 8). Von den fünf Stämmen mit typisierbarem O-Antigen gehörten zwei Isolate (Nr.648 und 669) zur O6-, zwei (Nr.800 und 814) zur O1- und ein Isolat (Nr.928a) zur O11-Serovar. Die anderen Stämme waren nicht O-typisierbar. Die Isolate 928a und b wurden aus derselben Urinprobe angezüchtet.

Während fünf Stämme beweglich waren, wovon bei zwei Isolaten (Nr.648 und 669) das H1-Antigen und bei dem Vakzinestamm (Nr.626) das H31-Antigen ermittelt werden konnte, waren drei Stämme (Nr.800, 814 und 928b) unbeweglich. Bei zwei Stämmen (Nr.711 und 714) war das Geißelantigen nicht typisierbar.

Die überwiegende Zahl der Stämme war durch ein nicht typisierbares Kapselantigen charakterisiert. Bei drei Stämmen konnte das K1- (Nr.800 und 814) bzw. das K6-Antigen (Nr.928a) erhoben werden.

Tab. 8: Probenahmedaten, Serovare, Biochemotypen und Genotypen der *E. coli*-Isolate der Patientin 2

Stamnummer	Probeneingangsdatum	Keimzahl / ml Urinprobe	Serovare	Biochemotypen	Genotypen
626	21.02.1989	>10 ⁵	O n.t. H 31 K n.t.	3716	A
643	18.04.1989	steril			
648	26.04.1989	>10 ⁵	O 6 H 1 K n.t.	7717	B
650	02.05.1989	steril			
669	06.07.1989	>10 ⁵	O 6 H 1 K n.t.	7737	B
711	23.11.1989	>10 ⁵	O n.t. H n.t. K n.t.	3737	C
714	30.11.1989	>10 ⁵	O n.t. H n.t. K n.t.	3717	C
800	13.08.1990	>10 ⁵	O 1 H - K 1	1674	D
814	28.09.1990	>10 ⁵	O 1 H - K 1	1674	D
863	27.02.1991	3x10 ³	O n.t. H + K n.t.	3234	E
928a	30.10.1991	<10 ⁴	O 11 H + K 6	3274	F
928b	30.10.1991	<10 ⁴	O n.t. H - K n.t.	3274	G
1124	13.05.1993	steril			

Legende: n.t.: nicht typisierbar; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm

Der Autovakzinestamm 626 und die Daten der drei Vakzineapplikationen sind rot unterlegt.

Bei den zehn Stämmen konnten acht Biochemotypen ermittelt werden (Tab. 9).

Tab. 9: Biochemotypisierungsergebnisse zu den *E. coli*-Isolaten der Patientin 2

Stammmummer	Isolierungsdatum	Keimzahl / ml Urinprobe	Serovare	Hämolyse	Fermentation von											Biochemotypen	Genotypen	
					Glycerol	Laktose	Lysin	Indol	Ornithin	Raffinose	Saccharose	Rhamnose	Dulcitol	Sorbitose	Salicin			
626	21.02.1989	>10 ⁵	O n.t. H 31 K n.t.	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	3716	A
648	26.04.1989	>10 ⁵	O 6 H 1 K n.t.	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	7717	B
669	06.07.1989	>10 ⁵	O 6 H 1 K n.t.	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	7737	B
711	23.11.1989	>10 ⁵	O n.t. H n.t. K n.t.	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	3737	C
714	30.11.1989	>10 ⁵	O n.t. H n.t. K n.t.	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	3717	C
800	13.08.1990	>10 ⁵	O 1 H- K 1	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	1674	D
814	28.09.1990	>10 ⁵	O 1 H- K 1	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	1674	D
863	27.02.1991	3x10 ³	O n.t. H+ K n.t.	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	3234	E
928a	30.10.1991	<10 ⁴	O 11 H+ K 6	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	3274	F
928b	30.10.1991	<10 ⁴	O n.t. H- K n.t.	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	3274	G
Codetriplets				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1			

Legende: n.t.: nicht typisierbar; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm
 (+) positive Reaktion – im Codetriplett mit 1, 2 bzw. 4 bewertet
 (-) negative Reaktion – im Codetriplett mit 0 bewertet
 Farbumterlegung: abweichende Reaktionen, die zu geringfügigen Änderungen des biochemischen Codes führen
 Codetriplets: additive Werte der positiven Reaktionen pro Triplett ergeben den biochemischen Code

Dabei waren die ersten fünf Stämme (Nr.626 bis 714) durch ähnliche Biochemotypen charakterisiert. Bei den beiden O6-Stämmen (Nr.648 und 669) mit den Biochemotypen 7717 und 7737 konnte der unter der Vakzinierung isolierte Stamm Nr.648 keine Saccharose fermentieren, während der nach der Vakzinierung isolierte Stamm Nr.669 diese Fähigkeit besaß (Tab. 9).

Auch von den beiden Stämmen Nr.711 und 714 mit nicht typisierbarem O-, H- und K-Antigen und den Biochemotypen 3737 und 3717 konnte der Stamm Nr.711 Saccharose abbauen, während der Stamm Nr.714 diese Stoffwechselleistung nicht besaß. Im Gegensatz zu den Hämolyse positiven O6-Stämmen waren die Stämme 711 und 714 sowie alle anderen Stämme Hämolyse negativ. Der Vakzinestamm (Nr.626) war der Stamm mit den wenigsten fermentativen Leistungen von diesen fünf Isolaten. Er war Hämolyse negativ und konnte zusätzlich zur Saccharose auch kein Salicin verstoffwechseln.

Die beiden O1-Stämme (Nr.800 und 814) waren biochemotypisch identisch (Biochemotyp: 1674) und ließen sich nicht weiter einordnen.

Der Stamm 863 war durch den Biochemotyp 3234 gekennzeichnet, der dem Biochemotyp 3274 der Stämme 928a und b, die aus einer Urinprobe isoliert worden waren, sehr ähnlich war. Die Stämme 928a und b konnten zusätzlich Raffinose abbauen (Tab. 9).

Nach Auswertung der Restriktionsmuster wurden sieben verschiedene Genotypen ermittelt (Abb. 3). Der Vakzinestamm mit dem Genotyp A wurde danach nicht wieder nachgewiesen. Die Stämme mit identischer Serovar und ähnlichem bzw. gleichem Biochemotyp konnten jeweils einem gleichen Genotyp zugordnet werden (Nr.648 und 669 Genotyp B; Nr.711 und 714 Genotyp C; Nr.800 und 814 Genotyp D). Die Stämme 863 und 928a und b mit unterschiedlichem Typisierungsverhalten der O:H:K-Antigene und ähnlichen bzw. identischen Biochemotypen wurden aufgrund der Restriktionsmuster verschiedenen Genotypen (Genotyp E bis G) zugeordnet, wobei aber eine gewisse Ähnlichkeit der Grundmuster zwischen den Stämmen 863 und 928b bestand. Die Differenz der Fragmente betrug jedoch mehr als drei.

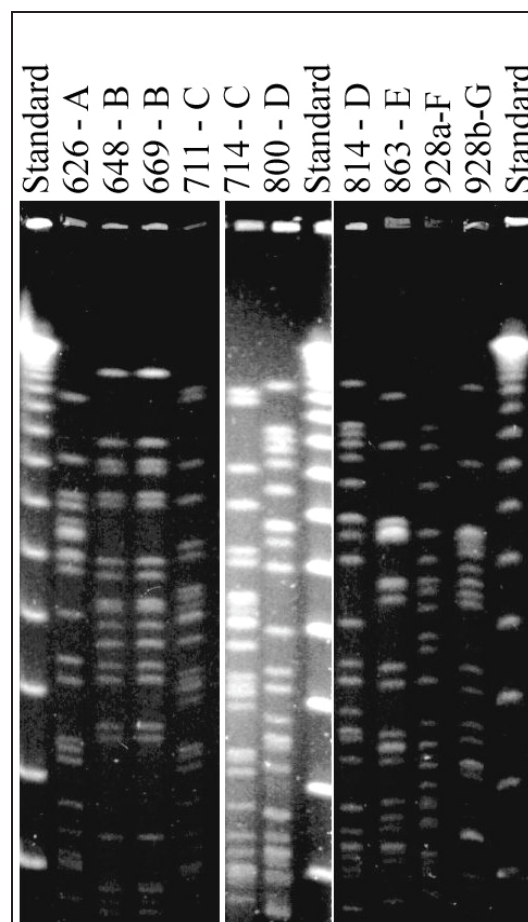


Abb. 3: Restriktionsmuster der genomischen DNA der *E. coli*-Stämme der Patientin 2 nach XbaI-Verdau und Auftrennung der Fragmente mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese

4.3 Patientin 3

Patientin 3, weiblich, 66 Jahre bei Beobachtungsbeginn, war an einer chronisch rezidivierenden Pyelonephritis erkrankt. 1970 wurde bei der Patientin aufgrund einer Nephrolithiasis und nachfolgend funktionsloser Niere die Nephrektomie rechts durchgeführt. Seit 1974 befand sich die Patientin in der Betreuung der nephrologischen Ambulanz der Inneren Medizin der Universität Rostock. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über fünf Jahre und drei Monate.

4.3.1 Vakzinierung

Die Patientin wurde im oben genannten Beobachtungszeitraum ein Mal vakziniert. Die Daten der Vakzinetherapie sind in der Tab. 10 beschrieben.

Tab. 10: Übersicht der Vakzinetherapie der Patientin 3

	Anzahl der Applikationen	Vakzinestammr.	Vakzineserotyp	Biochemotyp	Genotyp	Vakzinierungszeitraum
1. Vakzinierung	6	936	O 83 : H- : K1	3772	A	12.03.1992 – 15.04.1992

Legende: n.t.: nicht typisierbar; H-: unbeweglicher Stamm

Die Vakzinetherapie wurde mit einem unbeweglichen O83-Stamm durchgeführt, der das K1-Antigen trug. Die Patientin erhielt sechs Applikationen im wöchentlichen Abstand. Der Vakzinestamm wurde durch den Biochemotyp 3772 beschrieben und gehörte zum Genotyp A.

4.3.2 Bakterienstammcharakterisierung

Im Beobachtungszeitraum wurden neun Stämme isoliert (Tab. 11).

Von den sechs O-typisierbaren Stämmen gehörten der Stamm 927 und der Vakzinestamm (Nr.936) zur O83-Serovar, zwei Stämme (Nr.976 und 1018) zur O14-Serovar, ein Stamm (Nr.991) zur O19-Serovar und ein Stamm (Nr.1129) zur O3-Serovar. Die anderen drei Stämme (Nr.956, 1042 und 1182) waren nicht typisierbar.

Tab. 11: Probenahmedaten, Serovare, Biochemotypen und Genotypen der *E. coli*-Isolate der Patientin 3

	Probeneingangs- datum	Keimzahl /ml Urinprobe	Serovare	Biochemotypen	Genotypen
927	24.10.1991	$>10^5$	O 83 H- K 1	3772	A
936	28.11.1991	$>10^5$	O 83 H- K1	3772	A
956	06.02.1992	3×10^1	O n.t. H- K n.t.	3715	B
965	12.03.1992	steril			
12b	19.03.1992	steril			
12c	26.03.1992	steril			
12d	02.04.1992	steril			
976	08.04.1992	$>10^5$	O 14 H+ K n.t.	7611	C
12f	15.04.1992	steril			
991	07.05.1992	$<10^4$	O 19 H+ K n.t.	3710	D
1018	15.07.1992	$>10^5$	O 14 H+ K n.t.	3711	E
1042	21.09.1992	$>10^5$	O n.t. H+ K n.t.	3716	F
1129	15.06.1993	1×10^4	O 3 H+ K n.t.	3716	G
1182	25.04.1994	$>10^5$	O n.t. H- K 1	1712	H
1307	16.01.1996	$<10^4$	kein Stamm		
1345	12.09.1996	$<10^4$	kein Stamm		
1374	17.01.1997	steril			

Legende: n.t.: nicht typisierbar; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm

Der Stamm 936 wurde zur Herstellung der Autovakzine verwendet und sechs Mal appliziert (Tab. 11, rot unterlegt).

Während fünf der Stämme (Nr.976 bis 1129) beweglich waren, waren die verbleibenden vier Stämme (Nr.927, 936, 956 und 1182) nicht beweglich. Das Kapselantigen konnte nur bei den ersten beiden Stämmen und dem letzten Stamm (Nr.927, 936 und 1182) bestimmt werden (K1-Antigen). Die anderen Stämme hatten ein nicht typisierbares Kapselantigen.

Es konnten sieben Biochemotypen ermittelt werden (Tab. 11, Tab. 12). Der Stamm 927 und der Vakzinestamm (Nr.936) waren durch den identischen Biochemotyp 3772 charakterisiert. Alle anderen Stämme hatten ähnliche bzw. gleiche Biochemotypen (Nr.1042 und 1129 mit Biochemotyp 3716).

Der Stamm 976, der unter der Vakzinierung isoliert wurde, war als einziger Stamm Hämolyse positiv, während die anderen Stämme kein Hämolyse bildeten (Tab. 12). Der Hämolyse positive Stamm (Nr.976) konnte im Gegensatz zu den anderen Stämmen kein Ornithin abbauen und der letzte isolierte Stamm (Nr.1182) war der mit den wenigsten positiven Reaktionen und konnte als einziger kein Glycerol fermentieren.

Die biochemischen Eigenschaften für Dulcitol, Sorbose und Salicin wechselten (Tab. 12).

Tab. 12: Biochemotypisierungsergebnisse zu den *E. coli*-Isolaten der Patientin 3

Stammnummer	Isolierungsdatum	Keimzahl / ml Urinprobe	Serovare	Hämolysebildung	Fermentation von											Biochemotypen	Genotypen	
					Glycerol	Laktose	Lysin	Indol	Ornithin	Raffinose	Saccharose	Rhamnose	Dulcitol	Sorbose	Salicin			
927	24.10.1991	>10 ⁵	O 83 H- K 1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	3772	A
936	28.11.1991	>10 ⁵	O 83 H- K 1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	3772	A
956	06.02.1992	3x10 ¹	O n.t. H- K n.t.	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	3715	B
976	08.04.1992	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	7611	C
991	07.05.1992	<10 ⁴	O 19 H+ K n.t.	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	3710	D
1018	15.07.1992	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	3711	E
1042	21.09.1992	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	3716	F
1129	15.06.1993	1x10 ⁴	O 3 H+ K n.t.	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	3716	G
1182	25.04.1994	>10 ⁵	O n.t. H- K 1	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	1712	H
Codetriplets				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1			

Legende: n.t.: nicht typisierbar; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm
 (+) positive Reaktion – im Codetriplett mit 1, 2 bzw. 4 bewertet
 (-) negative Reaktion – im Codetriplett mit 0 bewertet
 Farbunterlegung: abweichende Reaktionen, die zu geringfügigen Änderungen des biochemischen Codes führen
 Codetriplets: additive Werte der positiven Reaktionen pro Triplett ergeben den biochemischen Code

Der Stamm 927 und der Vakzinestamm (Nr.936) waren serotypisch (O83:H-:K1), biochemotypisch (Biochemotyp 3772) und auch genotypisch (Genotyp A) identisch. Alle anderen Stämme hatten verschiedene Restriktionsmuster und wurden den Genotypen B bis H zugeordnet. Auch die Stämme 1042 und 1129 mit identischem Biochemotyp (Biochemotyp 3716) wurden verschiedenen Genotypen (Genotyp E und F) zugeordnet. Während bei dem Stamm 1042 das O-Antigen nicht typisierbar war, konnte bei Stamm 1129 die O3-Serovar erhoben werden.

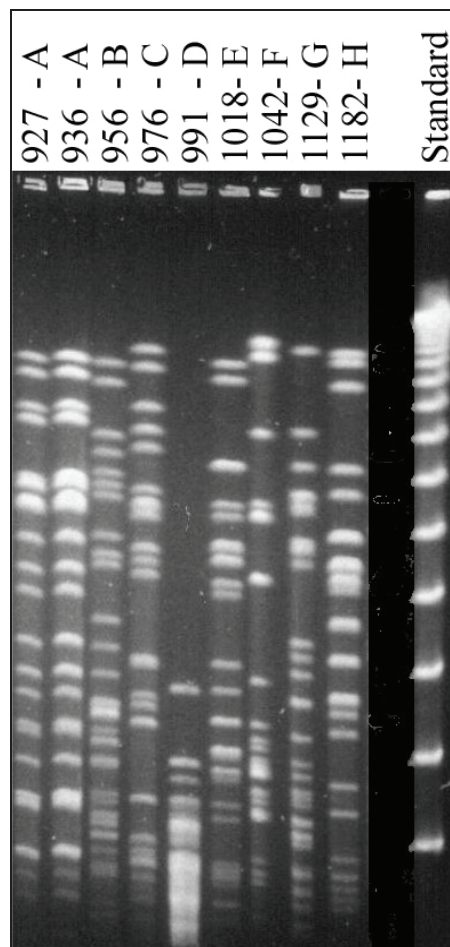


Abb. 4: Restriktionsmuster der genomischen DNA der *E. coli*-Stämme der Patientin 3 nach XbaI-Verdau und Auftrennung der Fragmente mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese

4.4 Patientin 4

Patientin 4, weiblich, 47 Jahre bei Beobachtungsbeginn, befand sich seit 1977 wegen rezidivierender Harnwegsinfekte in urologischer Behandlung. 1979 wurde sie in die nephrologische Ambulanz der Universität Rostock überwiesen. Es wurden chronisch rezidivierende Zystitiden nachgewiesen und eine rechtsseitige Ren mobile diagnostiziert.

Der Beobachtungszeitraum betrug ein Jahr und sieben Monate.

4.4.1 Vakzinierung

Bei der Patientin wurde im Beobachtungszeitraum ein Mal eine Vakzinetherapie durchgeführt. Die Vakzinierungsdaten sind in Tab. 13 beschrieben.

Tab. 13: Übersicht der Vakzinetherapie der Patientin 4

	Anzahl der Applikationen	Vakzinestammnr.	Vakzineserotyp	Biochemotyp	Genotyp	Vakzinierungszeitraum
1. Vakzinierung	6	1039	O2 : H+ : K1	3717	B	27.10.1992 – 01.12.1992

Legende: H+: beweglicher Stamm

Unter der Vakzinierung erhielt die Patientin sechs Applikationen im wöchentlichen Abstand. Der Vakzinestamm war ein beweglicher O2-Stamm mit dem Kapselantigen K1. Der Stamm wurde durch den Biochemotyp 3717 charakterisiert und gehörte zum Genotyp B. Der Vakzinierungszeitraum ist in der Tab. 13 beschrieben.

4.4.2 Bakterienstammcharakterisierung

Während des Beobachtungszeitraumes wurden acht Stämme isoliert (Tab. 14). Alle, außer der Stamm 1118, der ein nicht typisierbares O-Antigen hatte, konnten O-typisiert werden. Während der erste Stamm (Nr.941) zur O6-Serovar gehörte, wurden bei den anderen Stämmen (Nr.1039 bis 1065 und 1140) das O2-Antigen typisiert. Alle Stämme waren beweglich. Mit Ausnahme des O6-Stammes (Nr.941), der ein nicht typisierbares Kapselantigen hatte, wurde bei den O2-Stämmen (Nr.1039 bis 1065 und 1140) und dem nicht O-typisierbaren Stamm Nr.1118 das K1-Antigen ermittelt.

Tab. 14: Probenahmedaten, Serovare, Biochemotypen und Genotypen der *E. coli*-Isolate der Patientin 4

Stamnummer	Probeneingangsdatum	Keimzahl / ml Urinprobe	Serovare	Biochemotypen	Genotypen
941	20.12.1991	$>10^5$	O 6 H+ K n.t.	7777	A
1039	08.09.1992	$>10^5$	O 2 H+ K 1	3717	B
1040	16.09.1992	$>10^5$	O 2 H+ K 1	3717	B
1054	27.10.1992	steril			
1057	03.11.1992	$>10^5$	O 2 H+ K 1	3717	B
1059	10.11.1992	$<10^4$	O 2 H+ K 1	3717	B
1063	17.11.1992	steril			
1065	24.11.1992	$<10^4$	O 2 H+ K 1	3717	B
1069	01.12.1992	steril			
1118	04.05.1993	$<10^3$	O n.t. H+ K 1	3717	B
1140	05.07.1993	$<10^4$	O 2 H+ K 1	3717	B
1143	14.07.1993	steril			

Legende: n.t.: nicht typisierbar; H+: beweglicher Stamm

Der Stamm 1039 wurde für die Herstellung der Autovakzine verwendet und sechs Mal appliziert (Tab. 14, rot unterlegt)

Es konnten zwei Biochemotypen erhoben werden. Der O6-Stamm (Nr.941) wurde durch den Biochemotyp 7777 charakterisiert. Er war als einziger Stamm Hämolyisin positiv (Tab. 15). Bei dem Vakzinestamm (Nr.1039), den O2-Stämmen (Nr.1040 bis 1065 und 1140) sowie dem Stamm mit nicht typisierbarem O-Antigen (Nr.1118) wurde der identische Biochemotyp 3717 ermittelt.

Tab. 15: Biochemotypisierungsergebnisse zu den *E. coli*-Isolaten der Patientin 4

Stammnummer	Isolierungsdatum	Keimzahl /ml Urinprobe	Serovare	Hämolyisinbildung	Fermentation von											Biochemotypen	Genotypen
					Glycerol	Laktose	Lysin	Indol	Ornithin	Raffinose	Saccharose	Rhamnose	Dulcitol	Sorbose	Salicin		
941	20.12.1991	>10 ³	O 6 H+ K n.t.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7777	A
1039	08.09.1992	>10 ³	O 2 H+ K 1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	3717	B
1040	16.09.1992	>10 ³	O 2 H+ K 1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	3717	B
1057	03.11.1992	>10 ³	O 2 H+ K 1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	3717	B
1059	10.11.1992	<10 ⁴	O 2 H+ K 1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	3717	B
1065	24.11.1992	<10 ⁴	O 2 H+ K 1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	3717	B
1118	04.05.1993	<10 ³	O n.t. H+ K 1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	3717	B
1140	05.07.1993	<10 ⁴	O 2 H+ K 1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	3717	B
Codetriplets				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1		

Legende: n.t.: nicht typisierbar; H+: beweglicher Stamm
 (+) positive Reaktion – im Codetriplett mit 1, 2 bzw. 4 bewertet
 (-) negative Reaktion – im Codetriplett mit 0 bewertet
 Farbunterlegung: abweichende Reaktionen, die zu geringfügigen Änderungen des biochemischen Codes führen
 Codetriplets: additive Werte der positiven Reaktionen pro Triplett ergeben den biochemischen Code

Nach Auswertung der Restriktionsmuster gab es zwei Genotypen (Abb. 5). Die O6-Serovar (Nr.941) wurde dem Genotyp A zugeordnet. Der Vakzinestamm und die weiteren vor, während und nach der Vakzinierung isolierten Stämme gehörten zum Genotyp B. Außer dem Stamm 1118, der ein nicht typisierbares O-Antigen hatte, stimmten die Stämme in Serovar und Biochemotyp überein. Der Vakzinestamm war also unter und auch nach der Vakzinierung weiterhin nachweisbar, allerdings nur einmal in signifikanter Keimzahl.

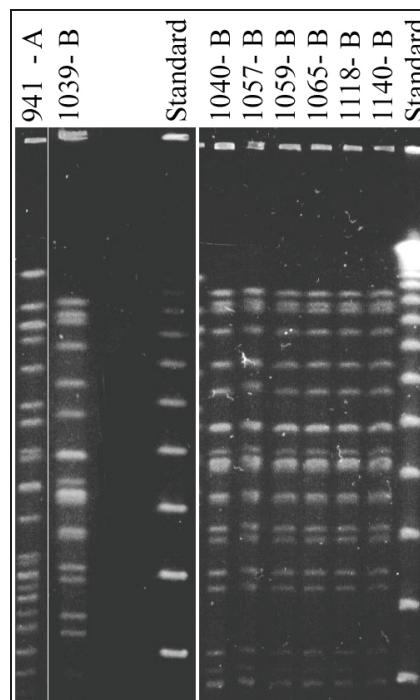


Abb. 5: Restriktionsmuster der genomischen DNA der *E. coli*-Stämme der Patientin 4 nach XbaI-Verdau und Auftrennung der Fragmente mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese

4.5 Patientin 5

Patientin 5, weiblich, 63 Jahre bei Beobachtungsbeginn, wurde wegen einer chronisch rezidivierenden Pyelonephritis seit 1988 in der nephrologischen Ambulanz der Inneren Medizin der Universität Rostock behandelt. Diese bestand laut klinischen Angaben schon Jahre bevor die Patientin in die Spezialambulanz überwiesen wurde. Während des Beobachtungszeitraums von neun Monaten wurden sechs *E. coli*-Stämme isoliert.

4.5.1 Vakzinierung

In der Beobachtungszeit wurde die Patientin ein Mal einer Vakzinetherapie zugeführt. Die Vakzinierungsdaten sind in Tab. 16 beschrieben.

Tab. 16: Übersicht der Vakzinetherapie der Patientin 5

	Anzahl der Applikationen	Vakzinestamm	Vakzineserotyp	Biochemotyp	Genotyp	Vakzinierungszeitraum
1. Vakzinierung	2	959	O39 : H- : K n.t.	3772	B	21.06.1992 und 26.06.1992

Legende: n.t.: nicht typisierbar; H-: unbeweglicher Stamm

Die Patientin erhielt zwei Applikationen im Abstand von einer Woche mit dem Vakzinestamm, einer unbeweglichen O39-Serovar mit nicht typisierbarem Kapselantigen. Der Stamm war durch den Biochemotyp 3772 charakterisiert und gehörte zum Genotyp B.

Nach der zweiten Applikation musste die Therapie aufgrund einer Harnwegsinfektion abgebrochen werden.

4.5.2 Bakterienstammcharakterisierung

In dem Beobachtungszeitraum wurden sechs Stämme isoliert (Tab. 17). Vier der Stämme (949 bis 986 und 1009) konnten als O39-Serovar identifiziert werden. Während ein Stamm (Nr.926) einer nicht O-typisierbaren Serovar entsprach, lag der Stamm 1007 als Rauhform vor.

Tab. 17: Probenahmedaten, Serovare, Biochemotypen und Genotypen der *E. coli*-Isolate der Patientin 5

Stamnummer	Probeneingangsdatum	Keimzahl / ml Urinprobe	Serovare	Biochemotypen	Genotypen
926	22.10.1991	>10 ⁵	O n.t. H+ K 30	3772	A
949	17.01.1992	>10 ⁵	O 39 H- K n.t.	7772	B
959	14.02.1992	>10 ⁵	O 39 H- K n.t.	3772	B
986	24.04.1992	>10 ⁵	O 39 H- K n.t.	3772	B
	19.06.1992				
1007	26.06.1992	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	3772	B
	Vakzinierungsabbruch				
1009	03.07.1992	>10 ⁵	O 39 H- K n.t.	3772	B

Legende: n.t.: nicht typisierbar; RF: Rauhform; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm

Aus dem Stamm 959 wurde die Autovakzine hergestellt. Die Vakzinierung wurde nach zwei Applikationen wegen einer HWI abgebrochen (Tab. 17, rot unterlegt).

Außer dem ersten Stamm (Nr.926), der beweglich war, waren alle anderen Stämme (Nr.949 bis 1009) unbeweglich. Bei dem beweglichen Stamm 926 konnte das K30-Antigen typisiert werden, während das Kapselantigen bei den restlichen Stämmen nicht typisierbar war.

Nach der Biochemotypisierung konnten bei fünf Stämmen der identische Biochemotyp 3772 und bei Stamm 949 der ähnliche Biochemotyp 7772 erhoben werden. Dieser bildete im Gegensatz zu allen anderen Stämmen Hämolyisin (Tab. 18). Serotypisch entsprach er dem Vakzinestamm (Nr.959), der einen Monat später isoliert wurde.

Tab. 18: Biochemotypisierungsergebnisse zu den *E. coli*-Isolaten der Patientin 5

Stammnummer	Isolierungsdatum	Keimzahl /ml Urinprobe	Serovare	Hämolysinbildung	Fermentation von											Biochemotypen	Genotypen
					Glycerol	Laktose	Lysin	Indol	Ornithin	Raffinose	Saccharose	Rhamnose	Dulcitol	Sorbose	Salicin		
926	22.10.1991	>10 ⁵	O n.t. H+ K 30	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	3772	A
949	17.01.1992	>10 ⁵	O 39 H- K n.t.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7772	B
959	14.02.1992	>10 ⁵	O 39 H- K n.t.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	3772	B
986	24.04.1992	>10 ⁵	O 39 H- K n.t.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	3772	B
1007	26.06.1992	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	3772	B
1009	03.07.1992	>10 ⁵	O 39 H- K n.t.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	3772	B
Codetriplets				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1		

Legende: n.t.: nicht typisierbar; RF:Rauhform; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm
 (+) positive Reaktion – im Codetriplett mit 1, 2 bzw. 4 bewertet
 (-) negative Reaktion – im Codetriplett mit 0 bewertet
 Farbunterlegung: abweichende Reaktionen, die zu geringfügigen Änderungen des biochemischen Codes führen
 Codetriplets: additive Werte der positiven Reaktionen pro Triplet ergeben den biochemischen Code

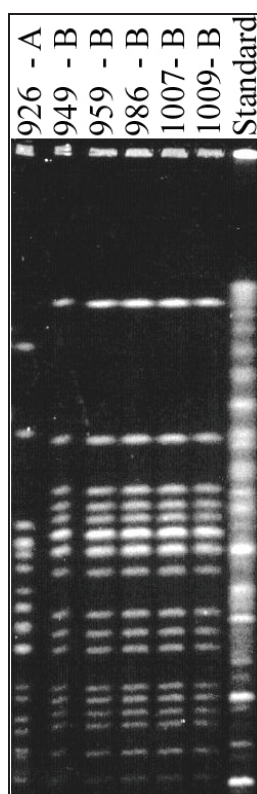


Abb. 6: Restriktionsmuster der genomischen DNA der *E. coli*-Stämme der Patientin 5 nach XbaI-Verdau und Auftrennung der Fragmente mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese

Nach Auswertung der Restriktionsmuster wurde der bewegliche nicht O-typisierbare Stamm mit K30-Antigen (Nr.926) dem Genotyp A und alle anderen Stämme dem Genotyp B zugeordnet (Abb. 6). Zwischen den Restriktionsmustern der beiden Genotypen bestanden mehr als drei Fragmente Differenz.

4.6 Patientin 6

Bei der Patientin 6, weiblich, 33 Jahre bei Beobachtungsbeginn, wurde 1987 eine fokal sklerosierende Glomerulonephritis diagnostiziert. Seit dieser Zeit befand sich die Patientin in der Behandlung der nephrologischen Ambulanz der Inneren Medizin der Universität Rostock. Des Weiteren litt die Patientin unter chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen und einer chronischen Niereninsuffizienz.

Die Patientin wurde innerhalb der Autovakzinetherapie über einen Zeitraum von einem Jahr und elf Monaten beobachtet, in dem vier *E. coli*-Stämme isoliert wurden.

4.6.1 Vakzinierung

Bei der Patientin wurde im Beobachtungszeitraum ein Mal eine Vakzinetherapie durchgeführt. In Tab. 19 sind die Vakzinierungsdaten beschrieben.

Tab. 19: Übersicht der Vakzinetherapie der Patientin 6

	Anzahl der Applikationen	Vakzinestammnr.	Vakzineserotyp	Biochemotyp	Genotyp	Vakzinierungszeitraum
1. Vakzinierung	6	966	O RF : H+ : K 30	3754	A	06.07.1992 – 10.08.1992

Legende: RF: Rauform; H+: beweglicher Stamm

Die Patientin erhielt während der Vakzinierung sechs Applikationen im wöchentlichen Abstand. Der Vakzinestamm war eine bewegliche Rauform mit dem Kapselantigen K30. Der Stamm war durch den Biochemotyp 3754 charakterisiert und gehörte zum Genotyp A. Der Vakzinierungszeitraum ist der Tab. 19 zu entnehmen.

4.6.2 Bakterienstammcharakterisierung

Im Beobachtungszeitraum wurden vier Stämme isoliert (Tab. 20). Während der Vakzinestamm (Nr.966) als Rauhform vorlag, waren die zwei unter bzw. nach der Vakzinierung isolierten Stämme (Nr.1011 und 1053) nicht O-typisierbar. Der letzte Stamm (Nr.1174) war eine O14-Serovar. Die Rauhform und der O14-Stamm (Nr.966 und 1174) waren beweglich. Von den beiden Stämmen mit nicht typisierbarem O-Antigen waren ein Stamm unbegeißelt und der andere durch ein nicht typisierbares H-Antigen gekennzeichnet. Das K-Antigen war nur bei dem Vakzinestamm (Nr.966) als K30-Antigen zu typisieren. Bei den anderen drei Stämmen (Nr.1011, 1053 und 1174) war das Kapselantigen nicht typisierbar.

Tab. 20: Probenahmedaten, Serovare, Biochemotypen und Genotypen der *E. coli*-Isolate der Patientin 6

Stammnummer	Probeneingangsdatum	Keimzahl / ml Urinprobe	Serovare	Biochemotypen	Genotypen
966	16.03.1992	$>10^5$	O RF H+ K 30	3754	A
1011	06.07.1992	$>10^5$	O n.t. H- K n.t.	3756	B
1016	13.07.1992	$<10^4$			
1020	20.07.1992	steril			
1023	27.07.1992	steril			
1024	03.08.1992	steril			
1030	10.08.1992	steril			
1053	23.10.1992	$>10^5$	O n.t. H n.t. K n.t.	3756	C
1174	17.02.1994	$>10^5$	O 14 H+ K n.t.	7716	D

Legende: n.t.: nicht typisierbar; RF: Rauhform; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm

Es konnten drei Biochemotypen ermittelt werden. Der Biochemotyp der zwei unter und nach der Vakzinierung isolierten Stämme (Biochemotyp 3756) unterschied sich nur im Fermentationsvermögen von Sorbose vom Biochemotyp des Vakzinestammes (Biochemotyp 3754). Diese beiden Stämme waren nicht O-typisierbar (Tab. 21).

Der O14-Stamm (Biochemotyp 7716) war als einziger Hämolyisin positiv, konnte aber keine Raffinose abbauen.

Tab. 21: Biochemotypisierungsergebnisse zu den *E. coli*-Isolaten der Patientin 6

Stammnummer	Isolierungsdatum	Keimzahl /ml Urinprobe	Serovare	Hämolysinbildung	Fermentation von											Biochemotypen	Genotypen
					Glycerol	Laktose	Lysin	Indol	Ornithin	Raffinose	Saccharose	Rhamnose	Dulcitol	Sorbose	Salicin		
966	16.03.1992	>10 ⁵	O RF H+ K 30	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	3754	A
1011	06.07.1992	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	3756	B
1053	23.10.1992	>10 ⁵	O n.t. H n.t. Kn.t.	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	3756	C
1174	17.02.1994	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	7716	D
Codetriplets				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1		

Legende: n.t.: nicht typisierbar; RF:Rauhform; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm
 (+) positive Reaktion – im Codetriplett mit 1, 2 bzw. 4 bewertet
 (-) negative Reaktion – im Codetriplett mit 0 bewertet
 Farbrunterlegung: abweichende Reaktionen, die zu geringfügigen Änderungen des biochemischen Codes führen

Die Auswertung der Restriktionsmuster zeigte vier verschiedene Genotypen A bis D (Abb. 7).
 Es konnten keine Ähnlichkeiten zwischen den Mustern festgestellt werden.

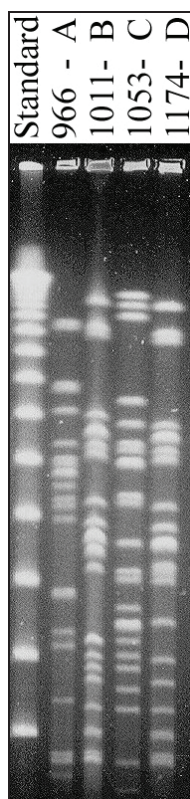


Abb. 7: Restriktionsmuster der genomischen DNA der *E. coli*-Stämme der Patientin 6 nach XbaI-Verdau und Auftrennung der Fragmente mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese

4.7 Patientin 7

Patientin 7, weiblich, 59 Jahre bei Beobachtungsbeginn, befand sich seit 1978 wegen einer schweren, chronisch rezidivierenden Pyelonephritis in der Behandlung der nephrologischen Ambulanz der Inneren Medizin der Universität Rostock. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über eine Zeit von vier Jahren und acht Monaten. Während der gesamten Zeit war die Patientin bakteriurisch.

4.7.1 Vakzinierung

Im Beobachtungszeitraum wurden zwei Vakzinetherapien durchgeführt. In Tab. 22 sind die Vakzinierungsdaten beschrieben.

Tab. 22: Übersicht der Vakzinetherapien der Patientin 7

	Anzahl der Applikationen	Vakzinestammnr.	Vakzineserotypen	Biochemotypen	Genotypen	Vakzinierungszeiträume
1. Vakzinierung	3	630	O2 : H1 : K n.t.	5712	A1	23.05.1989 – 07.06.1989
2. Vakzinierung	3	630	O2 : H1 : K n.t.	5712	A1	25.09.1990 – 09.10.1990

Legende: n.t.: nicht typisierbar

Die Vakzinierungen wurden mit demselben Vakzinestamm (Nr.630) durchgeführt, welcher durch den Biochemotyp 5712 und den Genotyp A1 charakterisiert war. Bei beiden Vakzinierungen erhielt die Patientin jeweils drei Applikationen im wöchentlichen Abstand. Die Vakzinierungszeiträume sind in der Tab. 22 aufgeführt.

4.7.2 Bakterienstammcharakterisierung

In der Beobachtungszeit wurden 25 Stämme isoliert (Tab. 23). 13 Stämme waren O-typisierbar. Es wurden drei O2-Stämme (Nr.630, 633 und 638), drei O9-Stämme (Nr.769, 783 und 792), zwei O17-Stämme (Nr.675 und 705b) und zwei O75-Stämme (Nr.1111b und 1163) ermittelt. Die Stämme 705a, 1043 und 1151 waren jeweils durch das O6-, O7- und das O8-Antigen charakterisiert. Vier Isolate (Nr.813 bis 824) waren nicht typisierbar, und weitere acht Stämme (Nr.644 bis 666, 903, 1086 und 1111a) lagen als Rauhformen vor.

Tab. 23: Probenahmedaten, Serovare, Biochemotypen und Genotypen der *E. coli*-Isolate der Patientin 7

Stamnummer	Probeneingangsdatum	Keimzahl / ml Urinprobe	Serovare	Biochemotypen	Genotypen
630	06.03.1989	>10 ⁵	O 2 H 1 K n.t.	5712	A1
633	15.03.1989	>10 ⁵	O 2 H 1 K n.t.	5716	A1
638	06.04.1989	>10 ⁵	O 2 H 1 K n.t.	5716	A1
644	19.04.1989	>10 ⁵	O RF H1 K n.t.	5716	A2
651	23.05.1989	>10 ⁵	O RF H1 K n.t.	5716	A2
653	30.05.1989	>10 ⁵	O RF H1 K n.t.	5716	A2
655	07.06.1989	>10 ⁵	O RF H1 K n.t.	5716	A2
666	21.06.1989	>10 ⁵	O RF H1 K n.t.	5716	A2
675	17.08.1989	>10 ⁵	O 17 H- K n.t.	1754	B1
704	14.09.1989	>10 ⁵			
705a	09.11.1989	>10 ⁵	O 6 H1 K 5	3716	C
705b	09.11.1989	>10 ⁵	O 17 H- K n.t.	3755	B2
769	20.04.1990	>10 ⁵	O 9 H n.t. K n.t.	7756	D
7154	14.05.1990	>10 ⁵			
783	28.05.1990	>10 ⁵	O 9 H n.t. K n.t.	5756	E
792	03.07.1990	>10 ⁵	O 9 H 16 K n.t.	7757	F
807	06.09.1990	>10 ⁵			
813	25.09.1990	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	1611	G
815	01.10.1990	~10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	1611	G
817	09.10.1990	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	1611	G
824	23.10.1990	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	1611	G
903	07.08.1991	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	3776	H
1043	22.09.1992	>10 ⁵	O 7 H+ K100	3776	
1086	22.01.1993	>10 ⁵	O RF H+ K n.t.	3776	I
1111a	16.04.1993	>10 ⁵	O RF H+ K 5	7777	J
1111b	16.04.1993	>10 ⁵	O 75 H+ K 5	7777	J
1151	26.07.1993	~8x10 ⁴	O 8 H- K n.t.	3773	K
1163	24.11.1993	>10 ⁵	O 75 H+ K 5	7776	J

Legende: n.t.: nicht typisierbar; RF: Rauhform; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm

Der Vakzinestamm 630 und die Daten der jeweils drei i.m.-Applikationen pro Vakzinetherapie sind in der Tab. 23 rot unterlegt.

Bei dem Vakzinestamm (Nr.630) und den um die erste Vakzinierung isolierten O2-Stämmen und Rauhformen, sowie bei dem O6-Stamm (Nr.705a) konnte das H1-Antigen typisiert werden. Bei einer O9-Serovar (Nr.792) wurde das H16-Antigen typisiert. Fünf weitere Stämme (Nr.1043 bis 1111b und 1163) waren beweglich. Während acht Stämme (Nr.675, 705b, 813 bis 903 und 1151) unbeweglich waren, wurden zwei Stämme (Nr.769 und 783) durch ein nicht typisierbares Geißelantigen gekennzeichnet.

Die Mehrzahl der Isolate hatte ein nicht typisierbares Kapselantigen. Vier Mal (Nr.705a, 1111a und b und 1163) war das K5-Antigen zu ermitteln und ein Mal konnte das K100-Antigen typisiert werden.

Es konnten insgesamt 13 Biochemotypen erhoben werden. Der Vakzinestamm (Nr.630) war durch den Biochemotyp 5712 charakterisiert und konnte kein Dulcitol fermentieren (Tab. 24, orange unterlegt), während die weiteren O2-Stämme und Rauhformen (Nr.633 bis 666) durch den ähnlichen Biochemotyp 5716 charakterisiert waren und Dulcitol abbauen konnten (Tab. 24).

Die drei Stämme der O9-Serovar (Nr.769 bis 792) waren durch ähnliche Biochemotypen gekennzeichnet. Der Stamm 783 konnte als einziger kein Glycerol abbauen, und der Stamm 792 konnte zusätzlich zu den anderen Stoffwechselleistungen auch Salicin fermentieren (Tab. 24, orange unterlegt).

Die während und nach der zweiten Vakzinierung isolierten Stämme (Nr.813 bis 824) wurden durch den identischen Biochemotyp 1611 charakterisiert.

Nach der zweiten Vakzinierung wurde eine unbewegliche Rauhform (Nr.903), ein O7-Stamm (Nr.1043) und eine bewegliche Rauhform (Nr.1086) angezüchtet, bei denen der identische Biochemotyp 3776 vorlag.

Die Rauhform 1111a und der O75-Stamm 1111b mit dem gemeinsamen Biochemotyp 7777 wurden aus derselben Urinprobe isoliert und sind durch das K5-Antigen charakterisiert. Bei der anderen O75-Serovar (Nr.1163), die das gleiche Kapselantigen trug, wurde der ähnliche Biochemotyp 7776 ermittelt. Der Stamm konnte kein Salicin verstoffwechseln (Tab. 24 orange unterlegt).

Die Patientin war während der Vakzinetherapien bakteriurisch. In der Zeit nach der ersten Vakzinierung hielten die gehäuften signifikanten Bakteriurien unverändert an, während in den zwei Jahren nach der zweiten Vakzinierung nur noch einmal pro Jahr eine Bakteriurie festgestellt wurde. Erst im darauf folgenden Jahr nahm die Frequenz der Bakteriurien wieder zu.

Tab. 24: Biochemotypisierungsergebnisse zu den *E. coli*-Isolaten der Patientin 7

Stammnummer	Isolierungsdatum	Keimzahl /ml Urinprobe	Serovare	Hämolysininbildung	Fermentation von											Biochemotypen	Genotypen
					Glycerol	Laktose	Lysin	Indol	Ornithin	Raffinose	Saccharose	Rhamnose	Dulcitol	Sorbose	Salicin		
630	06.03.1989	>10 ⁵	O 2 H 1 K n.t.	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	5712	A1
633	15.03.1989	>10 ⁵	O 2 H 1 K n.t.	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	5716	A1
638	06.04.1989	>10 ⁵	O 2 H 1 K n.t.	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	5716	A1
644	19.04.1989	>10 ⁵	O RF H 1 K n.t.	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	5716	A2
651	23.05.1989	>10 ⁵	O RF H 1 K n.t.	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	5716	A2
653	30.05.1989	>10 ⁵	O RF H 1 K n.t.	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	5716	A2
655	07.06.1989	>10 ⁵	O RF H 1 K n.t.	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	5716	A2
666	21.06.1989	>10 ⁵	O RF H 1 K n.t.	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	5716	A2
675	17.08.1989	>10 ⁵	O 17 H- K n.t.	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	1754	B1
705a	09.11.1989	>10 ⁵	O 6 H 1 K 5	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	3716	C
705b	09.11.1989	>10 ⁵	O 17 H- K n.t.	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	3755	B2
769	20.04.1990	>10 ⁵	O 9 H n.t. K n.t.	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	7756	D
783	28.05.1990	>10 ⁵	O 9 H n.t. K n.t.	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	5756	E
792	03.07.1990	>10 ⁵	O 9 H 16 K n.t.	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	7757	F
813	25.09.1990	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	1611	G
815	01.10.1990	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	1611	G
817	09.10.1990	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	1611	G
824	23.10.1990	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	1611	G
903	07.08.1991	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	3776	H
1043	22.09.1992	>10 ⁵	O 7 H+ K100	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	3776	
1086	22.01.1993	>10 ⁵	O RF H+ K n.t.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	3776	I
1111a	16.04.1993	>10 ⁵	O RF H+ K 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7777	J
1111b	16.04.1993	>10 ⁵	O 75 H+ K 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7777	J
1151	26.07.1993	~8x10 ⁴	O 8 H- K n.t.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	3773	K
1163	24.11.1993	>10 ⁵	O 75 H+ K 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	7776	J
Codetriplets				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1		

Legende: n.t.: nicht typisierbar; RF:Rauhform; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm
 (+) positive Reaktion – im Codetriplett mit 1, 2 bzw. 4 bewertet
 (-) negative Reaktion – im Codetriplett mit 0 bewertet
 Farbumterlegung: abweichende Reaktionen, die zu geringfügigen Änderungen des biochemischen Codes führen

Nach der Genotypisierung wurden 12 Genotypen abgegrenzt (Abb. 8). Der Vakzinestamm (Nr.630) und die bis nach Abschluss der ersten Vakzinierung angezüchteten Stämme (Nr.633 bis 666) wurden dem Genotyp A zugeordnet, wobei die O2-Stämme (Nr.630 bis 638) zum Subtyp A1 und die Rauhsformen aufgrund der Differenz eines Fragmentes zum Subtyp A2 gehörten. Die zwei O17-Stämme mit identischer Serovar aber differentem Biochemotyp gehörten zum Genotyp B, der gleichfalls aufgrund einer Differenz von drei Banden in die Subtypen B1 und B2 unterteilt wurde.

Die während und nach der zweiten Vakzinierung isolierten Stämme (Nr.813 bis 824) mit identischen Biochemotypen waren auch genotypisch identisch (Genotyp G). Auch die zwei O75-Serovare (Nr.1111b und 1163) und die Rauhsform Nr.1111a, die alle das K5-Antigen trugen und biochemotypisch ähnlich bzw. identisch waren, konnten einem Genotyp (Genotyp J) zugeordnet werden.

Dagegen waren die drei Stämme der O9-Serovar (Nr.769 bis 792) mit zwar ähnlichem Biochemotyp, wie auch die zwei Rauhsformen Nr.903 und 1086 und die O7-Serovar (Nr.1043) mit identischem Biochemotyp, verschiedenen Genotypen (D bis F, H und I) zuzuordnen.

Die Stämme 705a und 1151 zeichneten sich durch eigenständige Serovare, Biochemotypen und auch Genotypen aus.

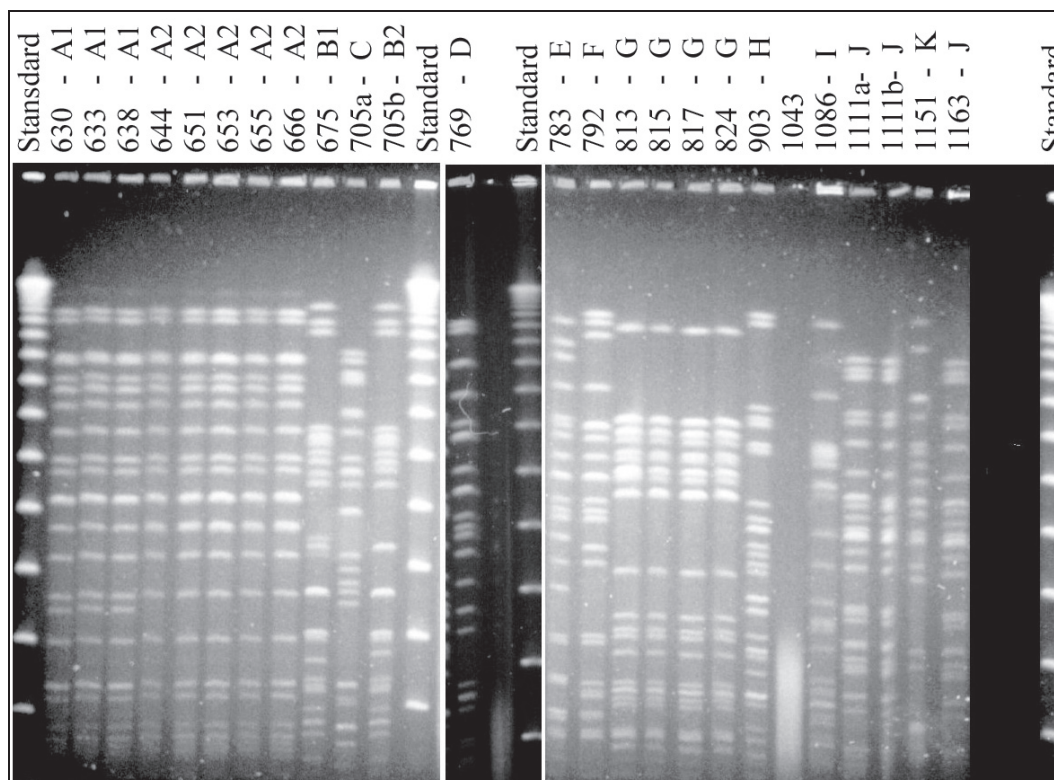


Abb. 8: Restriktionsmuster der genomischen DNA der *E. coli*-Stämme der Patientin 7 nach XbaI-Verdau und Auftrennung der Fragmente mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese

4.8 Patientin 8

Patientin 8, 70 Jahre bei Beobachtungsbeginn, befand sich seit 1980 in der nephrologischen Ambulanz der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock wegen einer chronischen Pyelonephritis bei vesikoureteralem Reflux in Behandlung. Innerhalb der Untersuchungen zur Autovakzinetherapie wurde die Patientin über zwei Jahre und vier Monate beobachtet.

4.8.1 Vakzinierung

In der Beobachtungszeit wurde die Patientin zwei Mal einer Vakzinetherapie unterzogen. Die Vakzinierungsdaten sind in Tab. 25 beschrieben.

Tab. 25: Übersicht der Vakzinetherapien der Patientin 8

	Anzahl der Applikationen	Vakzinestammnr.	Vakzineserotypen	Biochemotypen	Genotypen	Vakzinierungszeiträume
1. Vakzinierung	6	1218	O1 : H- : K1	1710	B1	03.03.1995-07.04.1995
2. Vakzinierung	6	1347	O1 : H- : K1	1710	B7	15.11.1996-19.12.1996

Legende: H-: unbeweglicher Stamm

Während beider Vakzinierungen erhielt die Patientin jeweils sechs Applikationen im wöchentlichen Abstand. Die Vakzinestämme waren serotypisch (Sero var: O1 : H- : K1) und biochemotypisch (Biochemotyp 1710) identisch und gehörten zum Genotyp B, wobei der erste Vakzinestamm (Nr.1218) dem Subtyp B1 und der zweite Vakzinestamm (Nr.1347) dem Subtyp B7 zugeordnet wurde.

4.8.2 Bakterienstammcharakterisierung

In der Beobachtungszeit konnten 15 *E. coli*-Stämme isoliert werden (Tab. 26). Alle Stämme gehörten zum Serotyp O1 : H- : K1. Während die Patientin in der Zeit der ersten Vakzinierung und danach bakteriurisch blieb, wurde mit Beginn der zweiten Vakzinierung kein weiterer Stamm isoliert. Der weitere Verlauf nach Abschluss der Vakzinierung lag zum Abschluss der Untersuchungen nicht vor und kann somit nicht beurteilt werden.

Tab. 26: Probenahmedaten, Serovare, Biochemotypen und Genotypen der *E. coli*-Isolate der Patientin 8

Stammnummer	Probeneingangsdatum	Keimzahl / ml Urinprobe	Serovare	Biochemotypen	Genotypen
1200	30.08.1994	>10 ⁵	O1 H- K1	1710	A1
1218	06.12.1994	>10 ⁵	O1 H- K1	1710	B1
1233	03.03.1995	7x10 ⁴	O1 H- K1	1710	B2
1239	10.03.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	1710	B3
1243	17.03.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	1710	B4
1247	23.03.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	1610	A1
1251	31.03.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	1710	A2
1252	07.04.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	1610	B4
1254	13.04.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	1710	B5
1258	28.04.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	1710	B3
1270	16.06.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	1710	B3
1280	18.08.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	1610	B6
1298	21.11.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	1710	B7
1326	03.05.1996	>10 ⁵	O1 H- K1	1610	B8
1347	17.09.1996	>10 ⁵	O1 H- K1	1710	B7
1360	15.11.1996	steril			
1364	21.11.1996	steril			
1366	28.11.1996	steril			
1369	05.12.1996	steril			
1370	12.12.1996	steril			
1371	19.12.1996	steril			

Legende: H-: unbeweglicher Stamm

Die Vakzinestämme 1218 und 1347 und die Daten der jeweils sechs i.m. Applikationen pro Vakzinetherapie sind in der Tab. 26 rot unterlegt.

Biochemotypisch wichen die Stämme 1247, 1252, 1280 und 1326 vom vorherrschenden Biochemotyp 1710 ab. Sie konnten im Gegensatz zu den anderen Isolatzen die Aminosäure Ornithin nicht verstoffwechseln, wodurch sich der Biochemotyp 1610 ergab (Tab. 27, orange unterlegt).

Tab. 27: Biochemotypisierungsergebnisse zu den *E. coli*-Isolaten der Patientin 8

Stamnummer	Isolierungsdatum	Keimzahl /ml Urinprobe	Serovare	Hämolysebildung	Fermentation von											Biochemotypen	Genotypen
					Glycerol	Laktose	Lysin	Indol	Ornithin	Raffinose	Saccharose	Rhamnose	Dulcitol	Sorbitose	Salicin		
1200	30.08.1994	>10 ³	O1 H- K1	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	1710	A1
1218	06.12.1994	>10 ³	O1 H- K1	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	1710	B1
1233	03.03.1995	7x10 ⁴	O1 H- K1	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	1710	B2
1239	10.03.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	1710	B3
1243	17.03.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	1710	B4
1247	23.03.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	1610	A1
1251	31.03.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	1710	A2
1252	07.04.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	1610	B4
1254	13.04.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	1710	B5
1258	28.04.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	1710	B3
1270	16.06.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	-	-		+	+	+	-	-	+	-	-	-	1710	B3
1280	18.08.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	1610	B6
1298	21.11.1995	>10 ⁵	O1 H- K1	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	1710	B7
1326	03.05.1996	>10 ³	O1 H- K1	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	1610	B8
1347	17.09.1996	>10 ³	O1 H- K1	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	1710	B7
Codetriplets				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1		

Legende: H-: unbeweglicher Stamm

(+) positive Reaktion – im Codetriplett mit 1, 2 bzw. 4 bewertet

(-) negative Reaktion – im Codetriplett mit 0 bewertet

Farbunterlegung: abweichende Reaktionen, die zu geringfügigen Änderungen des biochemischen Codes führen

Nach Auswertung der Restriktionsmuster wurden die Genotypen A und B erhoben (Abb. 9). Die Stämme 1200, 1247 und 1251 wurden dem Genotyp A zugeordnet und die verbliebenen Stämme (Nr.1218 bis 1243, 1252 bis 1347) dem Genotyp B.

Der Genotyp A wurde aufgrund einer Differenz von zwei Fragmenten in die Subtypen A1 und A2 unterteilt. Die Isolate 1200 und 1247 waren dem A1-Genotyp zugehörig und der Stamm 1251 dem Genotyp A2. Während der Stamm 1200 noch vor den Vakzinetherapien isoliert werden konnte, wurden die Stämme 1247 und 1251 unter der ersten Vakzinierung angezüchtet.

Der Genotyp B wurde in die Genotypen B1 bis B8 subklassifiziert. Zwischen den Restriktionsmustern der einzelnen Stämme lagen Differenzen von ein bis zwei Fragmenten vor. Dabei konnten dem Genotyp B3 drei Isolate (1239, 1258 und 1270) zugeordnet werden.

Den Genotypen B4 und B7 konnten jeweils zwei Stämme zugeordnet werden (B4: 1243 und 1252; B7: 1298 und 1347). Den Genotypen B1, B2, B5 und B6 gehörte jeweils ein Stamm an (Abb. 9).

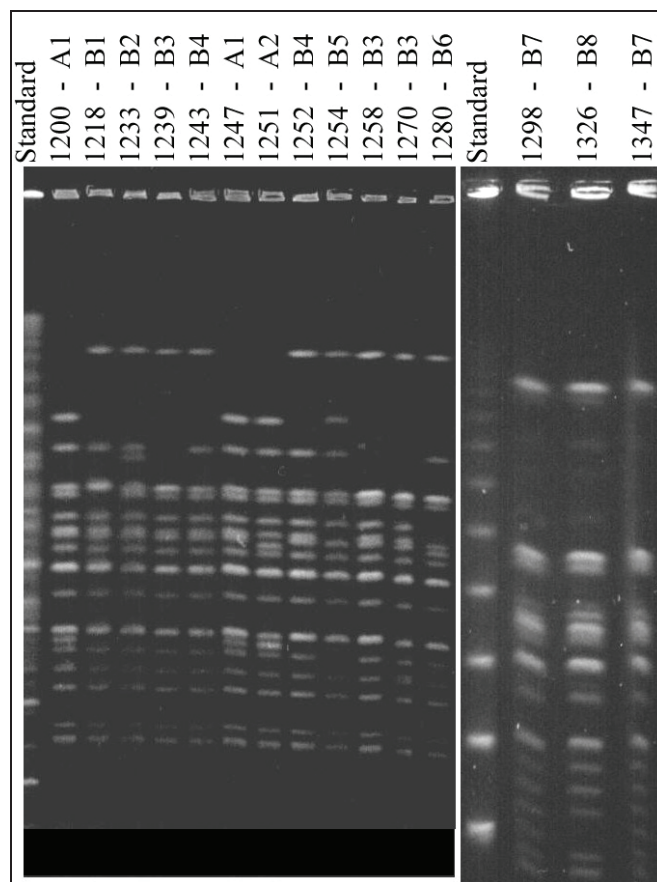


Abb. 9: Restriktionsmuster der genomischen DNA der *E. coli*-Stämme der Patientin 8 nach XbaI-Verdau und Auftrennung der Fragmente mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese

4.9 Patientin 9

Patientin 9, 43 Jahre bei Beobachtungsbeginn, wurde seit 1989 in der nephrologischen Ambulanz der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock wegen einer chronisch rezidivierenden Pyelonephritis, die 1961 erstmals auftrat, behandelt. Der Beobachtungszeitraum betrug sechs Jahre und vier Monate.

4.9.1 Vakzinierung

Im Beobachtungszeitraum von sechs Jahren und vier Monaten wurde die Patientin drei Mal einer Autovakzinierung unterzogen. Die Vakzinierungsdaten sind in Tab. 28 beschrieben.

Tab. 28: Übersicht der Vakzinetherapien der Patientin 9

	Anzahl der Applikationen	Vakzinestammnr.	Vakzinestamm	Biochemotyp	Genotyp	Vakzinierungszeitraum
1. Vakzinierung	3	685	O2 : H7 : K1	1756	A1	05.12.1989 – 06.02.1990
2. Vakzinierung	5	1045	O n.t. : H- : K n.t.	7704	E	19.11.1992 – 30.12.1992
3. Vakzinierung	6	1217	O11 : H- : K n.t.	1752		16.02.1995 – 22.03.1995

Legende: n.t.: nicht typisierbar; H-: unbeweglicher Stamm

Die Patientin erhielt während der Vakzinierungen drei bis sechs Applikationen im monatlichen bis wöchentlichen Abstand. Während der Vakzinierung bei der ersten und dritten Vakzinierung O-typisierbar war, wurde bei der zweiten Vakzinierung ein nicht typisierbarer Stamm appliziert. Biochemotypisch waren sich die Vakzinestämme der ersten und dritten Vakzinierung mit den Biochemotypen 1756 und 1752 sehr ähnlich, während der Biochemotyp 7704 des zweiten Vakzinestammes deutlich abwich. Der erste und zweite Vakzinestamm wurden als Genotyp A und E bezeichnet. Vom dritten Vakzinestamm konnte kein Genotyp erstellt werden.

Die Vakzinierungszeiträume sind der Tab. 28 zu entnehmen.

4.9.2 Bakterienstammcharakterisierung

Im Beobachtungszeitraum wurden elf *E. coli*-Stämme isoliert (Tab. 29). Von den fünf Stämmen mit typisierbarem O-Antigen, gehörten zwei Stämme (Vakzinestamm 685 und Stamm 726) zur Serovar O2, während drei Stämme (Nr. 935, 1137, 1217) zur Serovar O4, O14 bzw. O11 gehörten. Alle anderen nachgewiesenen *E. coli*-Stämme waren nicht O-typisierbar oder lagen als Rauhformen vor. Hinsichtlich der Beweglichkeit (H-Antigene) war die Mehrzahl der Stämme beweglich. Eine Typisierung wurde lediglich bei dem ersten Vakzinestamm (Nr. 685) vorgenommen und als H7 identifiziert. Die Typisierung der Kapselantigene ergab bei drei Stämmen (Nr. 685, 726 und 1244) ein K1-Antigen, während die O4-Serovar (Nr. 935) ein K3-Antigen besaß. Die Kapselantigene der restlichen Stämme waren nicht typisierbar.

Tab. 29: Probenahmedaten, Serovare, Biochemotypen und Genotypen der *E. coli*-Isolate der Patientin 9

Stamnummer	Probeneingangsdatum	Keimzahl / ml Urinprobe	Serovare	Biochemotypen	Genotypen
685	29.09.1989	>10 ⁵	O 2 H 7 K 1	1756	A1
715	05.12.1989	steril			
720	09.01.1990	steril			
726	06.02.1990	1x10 ¹	O 2 H- K 1	1756	A2
778	09.05.1990	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	1770	B
935	21.11.1991	>10 ⁵	O 4 H+ K 3	7677	C
1045	06.10.1992	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	7704	D
1055	28.10.1992	<10 ⁴	O n.t. H+ K n.t.	7777	E
1064	19.11.1992	steril			
1070	02.12.1992	steril			
1075	16.12.1992	steril			
1077	23.12.1992	steril			
1078	30.12.1992	steril			
1137	28.06.1993	1x10 ⁴	O 14 H+ K n.t.	3676	F
1217	06.12.1994	>10 ⁵	O 11 H- K n.t.	1752	
1227	16.02.1995	steril			
8IIIb	22.02.1995	steril			
1231	01.03.1995	steril			
1237	08.03.1995	steril			
1240	15.03.1995	steril			
1244	22.03.1995	>10 ⁵	O RF H+ K 1	5712	G
1271	21.06.1995	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	7716	H
1287	11.10.1995	>10 ⁵	O RF H+ K n.t.	3777	I
1308	17.01.1996	steril			

Legende: n.t.: nicht typisierbar; RF: Rauhform; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm

Die Vakzinestämme 685, 1045 und 1217 und die Daten der i.m. Applikationen pro Vakzinetherapie sind in der Tab. 29, rot unterlegt.

Insgesamt konnten 10 verschiedene Biochemotypen erhoben werden. Die beiden O2-Serovar-Stämme (Nr. 685 und 726) waren biochemotypisch identisch (Biochemotyp 1756). Während beim Vakzinestamm (Nr. 685) das H7-Antigen typisiert werden konnte, war der unter der Vakzinierung nachgewiesene Stamm (Nr. 726) unbeweglich.

Die nach der Vakzinierung angezüchteten *E. coli*-Stämme (Nr. 778 bis 1055) wiesen biochemotypisch Ähnlichkeiten auf. Während das erste Isolat nach der Vakzinierung (Nr. 778) Glycerol, Dulcitol, Sorbose und Salicin nicht abbauen konnte und kein Hämolyisin bildete, konnten die drei anderen Stämme Dulcitol fermentieren und zwei der Stämme Sorbose und Salicin. Sie sind außerdem alle drei Hämolyisin positiv (Tab. 30, orange unterlegt). Besondere Ähnlichkeiten im Biochemotyp bestanden zwischen der O4-Serovar (Nr. 935) und dem nicht typisierbaren Stamm (Nr. 1055), die sich nur im Ornithinabbau unterschieden (Biochemotyp 7677 bzw. 7777, Tab. 30, orange unterlegt). Die nach der zweiten (Nr. 1137 und 1217) sowie unter bzw. nach der dritten Vakzinierung auftretenden Stämme (Nr. 1244, 1271 und 1287) zeigten gewisse Ähnlichkeiten, ließen sich aber nicht eindeutig zuordnen.

Tab. 30: Biochemotypisierungsergebnisse zu den *E. coli*-Isolaten der Patientin 9

Stamnummer	Isolierungsdatum	Keimzahl /ml Urinprobe	Serovare	Hämolyisinbildung	Fermentation von											Biochemotypen	Genotypen
					Glycerol	Laktose	Lysin	Indol	Ornithin	Raffinose	Saccharose	Rhamnose	Dulcitol	Sorbose	Salicin		
685	29.09.1989	>10 ⁵	O 2 H 7 K 1	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	1756	A1
726	06.02.1990	1x10 ⁴	O 2 H- K 1	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	1756	A2
778	09.05.1990	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1770	B
935	21.11.1991	>10 ⁵	O 4 H+ K 3	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	7677	C
1045	06.10.1992	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	7704	D
1055	28.10.1992	<10 ⁴	O n.t. H+ K n.t.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7777	E
1137	28.06.1993	1x10 ⁴	O 14 H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	F
1217	06.12.1994	>10 ⁵	O 11 H- K n.t.	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	1752	
1244	22.03.1995	>10 ⁵	O RF H+ K 1	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	5712	G
1271	21.06.1995	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	7716	H
1287	11.10.1995	>10 ⁵	O RF H+ K n.t.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3777	I
Codetriplets				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1		

Legende: n.t.: nicht typisierbar; RF: Rauhform; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm
 (+) positive Reaktion – im Codetriplett mit 1, 2 bzw. 4 bewertet
 (-) negative Reaktion – im Codetriplett mit 0 bewertet
 Farbung: abweichende Reaktionen, die zu geringfügigen Änderungen des biochemischen Codes führen

Wie die Biochemotypisierung zeigte auch die Genotypisierung mehrere Stammvarianten. Bis auf die beiden O2-Serovar-Stämme wurden für alle anderen Stämme unterschiedliche Genotypen ermittelt.

Nach Auswertung der Restriktionsmuster wurden die Stämme 685 und 726 mit dem O2-Antigen dem Genotyp A zugeordnet. Aufgrund einer Bandendifferenz von zwei Fragmenten erfolgte eine Subtypisierung in die Genotypen A1 und A2 (Tab. 29, Abb. 10). Dieser Genotyp wurde niemals wieder nachgewiesen.

Die Restriktionsmuster der nach der ersten Vakzinierung angezüchteten Isolate unterschieden sich eindeutig, so dass sie als Genotypen B bis I bezeichnet wurden. Das ist auch aus Abb. 10 ersichtlich. Trotz wiederholter Versuche konnte vom Stamm 1217 keine Genotypisierung erfolgen.

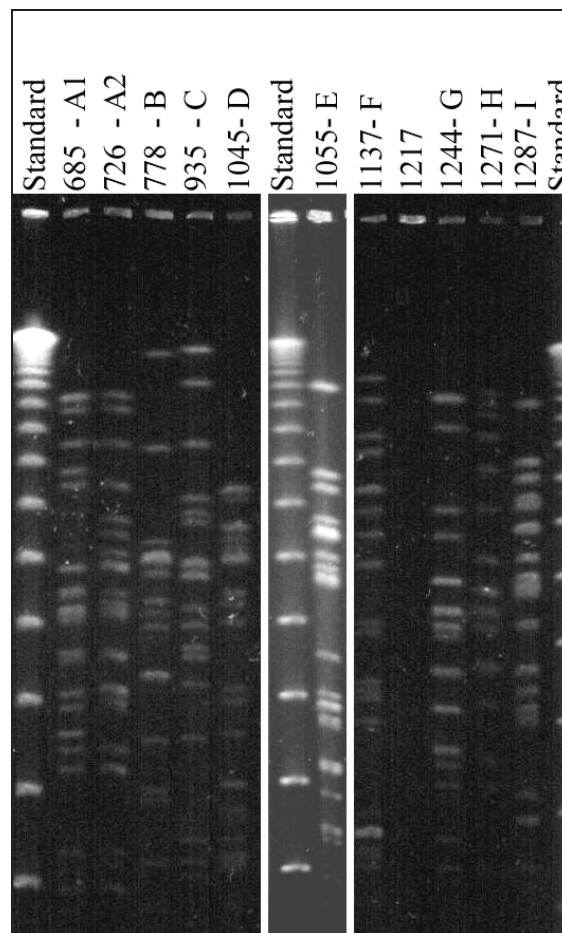


Abb. 10: Restriktionsmuster der genomischen DNA der *E. coli*-Stämme der Patientin 9 nach XbaI-Verdau und Auftrennung der Fragmente mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese

4.10 Patientin 10

Die Patientin 10, 33 Jahre bei Beobachtungsbeginn, wurde in der nephrologischen Ambulanz der Klinik für Innere Medizin seit 1981 überwacht und therapiert. Seit der Kindheit war eine chronische Pyelonephritis bekannt. Später traten gehäuft zystitische Beschwerden auf. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über sieben Jahre und drei Monate.

4.10.1 Vakzinierung

Die Patientin wurde insgesamt drei Mal vakziniert. Die Vakzinierungsdaten sind in Tab. 31 beschrieben.

Tab. 31: Übersicht der Vakzinetherapien der Patientin 10

	Anzahl der Applikationen	Vakzinestammnr.	Vakzineserotypen	Biochemotypen	Genotypen	Vakzinierungszeiträume
1. Vakzinierung	3	620	O RF : H n.t. : K n.t.	3611	A	13.06.1989 – 27.06.1989
2. Vakzinierung	3	859	O24 : H+ : K24	1677	C3	19.06.1991 – 28.08.1991
3. Vakzinierung	6	1071	O n.t. : H- : K n.t.	3767	D	07.04.1993 – 12.05.1993

Legende: n.t.: nicht typisierbar; RF: Rauform; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm

Die Patientin erhielt während der ersten und zweiten Vakzinierung drei Applikationen im monatlichen bzw. wöchentlichen Abstand. Die dritte Vakzinierung wurde mit sechs Applikationen im wöchentlichen Abstand durchgeführt. In den Vakzinierungen kamen eine Rauform, eine O24-Serovar und ein nicht typisierbarer Stamm zur Anwendung. Die Stämme wiesen biochemotypisch Ähnlichkeiten auf, waren aber genotypisch unterschiedlich und den Genotypen A, C3 und D zuzuordnen. Die Vakzinierungszeiträume sind der Tab. 31 zu entnehmen.

4.10.2 Bakterienstammcharakterisierung

Im Beobachtungszeitraum wurden zehn *E. coli*-Stämme isoliert (Tab. 32). Von den fünf Stämmen, bei denen das Oberflächenantigen typisierbar war, gehörten jeweils zwei zur O6-Serovar (Nr. 716 und 933) und zur O24-Serovar (Nr. 831 und 859) und ein Stamm (Nr. 668) zur O9-Serovar. Während der Vakzinestamm sowie zwei weitere Stämme als Rauform vorlagen (Nr. 620, 1183 und 1196), war bei zwei Stämmen das O-Antigen nicht typisierbar (1036 und 1071). Die überwiegende Anzahl der Stämme war unbeweglich. Die Typisierung der Kapselantigene ergab bei jeweils zwei Stämmen ein K24- (Nr. 831 und 859) bzw. ein K36-Antigen (Nr. 668 und 1036). Die Kapselantigene der übrigen Stämme waren nicht typisierbar.

Tab. 32: Probenahmedaten, Serovare, Biochemotypen und Genotypen der *E. coli*-Isolate der Patientin 10

Stamnummer	Probeneingangsdatum	Keimzahl / ml Urinprobe	Serovare	Biochemotypen	Genotypen
620	30.01.1989	>10 ⁵	O RF H n.t. K n.t.	3611	A
661	13.06.1989	steril			
665	20.06.1989	steril			
668	27.06.1989	~10 ²	O 9 H- K 36	3610	B
716	06.12.1989	>10 ⁵	O 6 H- K n.t.	3777	C1
831	07.11.1990	>10 ⁵	O 24 H- K 24	3777	C2
859	06.02.1991	>10 ⁵	O 24 H+ K 24	1677	C3
898	19.06.1991	steril			
900	01.08.1991	steril			
908	28.08.1991	steril			
933	13.11.1991	~10 ⁴	O 6 H+ K n.t.	7677	C4
1036	26.08.1992	>10 ⁵	O n.t. H- K 36	7777	C5
1071	02.12.1992	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	3767	D
1105	07.04.1993	steril			
1109	14.04.1993	steril			
1113	21.04.1993	steril			
1115	28.04.1993	steril			
1120	05.05.1993	steril			
1123	12.05.1993	steril			
1183	27.04.1994	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	7777	C6
1196	10.08.1994	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	7737	C4
1327	08.05.1996	steril			

Legende: n.t.: nicht typisierbar; RF: Rauform; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm

Die Vakzinestämme 620, 859 und 1071 und die Daten der i.m. Applikationen pro Vakzinetherapie sind in der Tab. 32 rot unterlegt.

Der erste Vakzinestamm (Nr. 620) war nach Abschluss der Vakzinierung nicht wieder nachweisbar. Unter der Vakzinierung kam es zu einem Keimwechsel. Der O9-Stamm (Nr. 668) ähnelte im Biochemotyp dem Vakzinestamm.

Nach der ersten Vakzinierung kam es zu einem weiteren Erregerwechsel, der sich serotypisch und biochemotypisch ständig veränderte. Bei dem Oberflächenantigen gab es einen Wechsel vom O6- zum O24-Antigen und später zur nicht typisierbaren Form. Nach einer Zeit von 20 Monaten trat der Stamm erneut in Erscheinung, aber jetzt als Rauhform.

Innerhalb der 20 Monate war einmalig ein genotypisch anderer Erreger (Nr.: 1071; O n.t.:H-:K n.t., Biochemotyp: 3767, Genotyp: D) nachweisbar.

Durch die Biochemotypisierung ließen sich acht Biochemotypen erheben. Der Vakzinestamm 620 und die O9-Serovar (Nr. 668) waren durch einen ähnlichen Biochemotyp charakterisiert.

Die nach der ersten Vakzinierung isolierten Stämme sind durch ähnliche bzw. identische Biochemotypen gekennzeichnet. Dabei wurden die unbewegliche O6- (Nr.716) und O24-Serovar (Nr.831) durch den identischen Biochemotyp 3777 charakterisiert. Bei den beweglichen O6- und O24-Serovaren wurden ähnliche Biochemotypen erhoben (Biochemotyp: 1677 bzw. 7677).

Während der als Vakzinestamm verwendete bewegliche O24-Stamm noch Hämolyisin negativ war, wurden alle nach der zweiten Vakzinierung isolierten Stämme (Nr.933, 1036, 1183 und 1196), mit Ausnahme des Stammes 1071, Hämolyisin positiv (Tab. 33, orange unterlegt).

Tab. 33: Biochemotypisierungsergebnisse zu den *E. coli*-Isolaten der Patientin 10

Stammnummer	Isolierungsdatum	Keimzahl /ml Urinprobe	Serovare	Hämolyisinbildung	Fermentation von											Biochemotypen	Genotypen
					Glycerol	Laktose	Lysin	Indol	Ornithin	Raffinose	Saccharose	Rhamnose	Dulcitol	Sorbitose	Salicin		
620	30.01.1989	>10 ⁵	O RF H n.t. K n.t.	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	3611	A
668	27.06.1989	1x10 ²	O 9 H- K 36	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	3610	B
716	06.12.1989	>10 ⁵	O 6 H- K n.t.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3777	C1
831	07.11.1990	>10 ⁵	O 24 H- K 24	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3777	C2
859	06.02.1991	>10 ⁵	O 24 H+ K 24	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	1677	C3
933	13.11.1991	~10 ⁴	O 6 H+ K n.t.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	7677	C4
1036	26.08.1992	>10 ⁵	O n.t. H- K 36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7777	C5
1071	02.12.1992	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	3767	D
1183	27.04.1994	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7777	C6
1196	10.08.1994	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	7737	C4
Codetriplets				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1		

Legende: n.t.: nicht typisierbar; RF: Rauhform; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm
 (+) positive Reaktion – im Codetriplett mit 1, 2 bzw. 4 bewertet
 (-) negative Reaktion – im Codetriplett mit 0 bewertet
 Farbumterlegung: abweichende Reaktionen, die zu geringfügigen Änderungen des biochemischen Codes führen

Die Stämme 1036 und 1183 wurden durch den identischen Biochemotyp 7777 charakterisiert und unterschieden sich nur durch das Hämolyseverhalten von den biochemotypisch identischen Stämmen 716 und 831 (Biochemotyp 3777), die vor der zweiten Vakzinierung isoliert wurden (Tab. 33, orange unterlegt).

Weiterhin gab es Abweichungen im Abbau von Glycerol (Nr.859), Ornithin (Nr.859 und 933) und Raffinose (Nr.1196) (Tab. 33, orange unterlegt).

Der Stamm 1071 war zwar durch den ähnlichen Biochemotyp 3767 charakterisiert, aber nicht näher einzuordnen.

Nach Auswertung der Restriktionsmuster konnten bei den zehn Stämmen vier Genotypen A – D erhoben werden (Abb. 11). Während sich die Restriktionsmuster der Stämme 620 (Genotyp: A), 668 (Genotyp: B) und 1071 (Genotyp: D) von denen der verbliebenen Stämme (Genotyp: C1 –C6) grundlegend unterschieden, besaßen die Stämme 716 bis 1036, 1183 und 1196 ein gleiches Grundmuster. Sie gehörten zum Genotyp C. Aufgrund der Abweichungen von ein bis drei Fragmenten im Restriktionsmuster wurde innerhalb des Genotyps C eine Subtypisierung von C1 bis C6 vorgenommen (Abb. 11). Zwei Stämme (Nr. 933 und 1196) konnten dem Genotyp C4 zugeordnet werden.

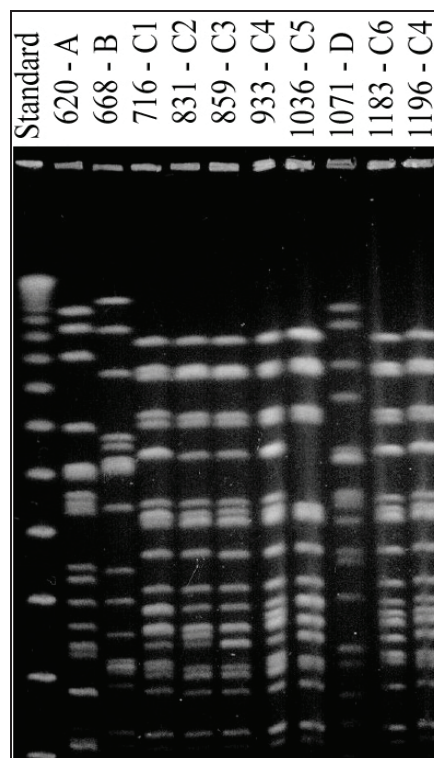


Abb. 11: Restriktionsmuster der genomischen DNA der *E. coli*-Stämme der Patientin 10 nach XbaI-Verdau und Auftrennung der Fragmente mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese

4.11 Patientin 11

Patientin 11, 59 Jahre bei Beobachtungsbeginn, befand sich seit 1976 wegen einer chronischen Zystitis in der nephrologischen Ambulanz der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock in Behandlung. Der Beobachtungszeitraum betrug acht Jahre und zwei Monate.

4.11.1 Vakzinierung

In dem Beobachtungszeitraum wurde die Patientin vier Mal einer Vakzinetherapie unterzogen. In Tab. 34 sind die Vakzinierungsdaten beschrieben.

Tab. 34: Übersicht der Vakzinetherapien der Patientin 11

	Anzahl der Applikationen	Vakzinestammnr.	Vakzineserotypen	Biochemotypen	Genotypen	Vakzinierungszeiträume
1. Vakzinierung	3	9172	O8 : H n.t. : K n.t.			03.10.1988 - 18.10.1988
2. Vakzinierung	3	627	O83 : H31 : K n.t.	7776	C	06.03.1990 - 30.04.1990
3. Vakzinierung	6	1114	O14 : H+ : K n.t.	3676	S	09.06.1993 - 14.07.1993
4. Vakzinierung	6	1212	ORF : H+ : K5	3711	X	23.02.1995 – 30.03.1995

Legende: n.t.: nicht typisierbar; RF: Rauhform; H+: beweglicher Stamm

Die Patientin erhielt während der ersten und zweiten Vakzinierung jeweils drei Applikationen im Abstand von einer Woche beim ersten Vakzinierungszyklus und im Abstand von einem Monat beim zweiten Vakzinierungszyklus. Während der dritten und vierten Vakzinierung erfolgten jeweils sechs Applikationen im wöchentlichen Abstand. Es kamen vier verschiedene Vakzinestämme zur Anwendung. Der erste Vakzinestamm, eine O8-Serovar mit nicht typisierbarem H- und K-Antigen, wurde vor Beginn der Studie isoliert. Er wurde weder einer Biochemotypisierung noch einer Genotypisierung unterzogen.

Während der zweite und dritte Vakzinestamm (Nr.627 und 1114) durch das Oberflächenantigen O83 und O14 gekennzeichnet waren, wurde die vierte Vakzinierung mit einer Rauhform (Nr.1212) durchgeführt. Die Stämme waren beweglich. Bei dem zweiten Vakzinestamm (Nr.627) konnte das H31-Antigen typisiert werden. Das Kapselantigen wurde

nur bei dem letzten Vakzinestamm (Nr.1212) als K5-Antigen identifiziert, während es bei den anderen Vakzinestämmen nicht typisierbar war.

Bis auf den ersten, wurden die anderen Vakzinestämme durch drei Biochemotypen charakterisiert, wobei gewisse Ähnlichkeiten zwischen dem Biochemotyp des zweiten Vakzinestammes (Biochemotyp 7776), und dem des dritten Vakzinestammes (Biochemotyp 3676) zu verzeichnen waren. Der dritte Vakzinestamm war im Gegensatz zum zweiten Hämolysin und Ornithin negativ.

Nach der Genotypisierung gehörte der zweite bis vierte Vakzinestamm den Genotypen C, S und X an. Von dem ersten Vakzinestamm wurde aus o. g. Grund kein Restriktionsmuster erstellt.

4.11.2 Bakterienstammcharakterisierung

Bei Patientin 11 wurden insgesamt 53 *E. coli*-Stämme isoliert, von denen 52 Stämme den weiterführenden Untersuchungen wie der Biochemo- und der Genotypisierung zur Verfügung standen (Tab. 35). Von den 52 untersuchten Stämmen besaß die Hälfte der Stämme ($n = 26$) ein typisierbares O-Antigen, bei 12 Stämmen war das O-Antigen nicht typisierbar und 14 Stämme lagen als Rauhform vor.

Von 26 O-typisierbaren Stämmen waren 13 Isolate durch das O14-Antigen (Nr.1066, 1114 bis 1138, 1144, 1148a, 1152a, 1165a, 1176 und 1192) und jeweils fünf Stämme durch das O18- (Nr.780 bis 797, 816 und 835) bzw. O83-Antigen (Nr.11341 bis 627) charakterisiert. Zwei Stämme konnten dem O23-Antigen (Nr.858 und 920) und ein Stamm dem O21-Antigen (Nr.1306) zugeordnet werden.

Während 24 Stämme unbeweglich waren, wurde bei 28 Stämmen eine Begeißelung festgestellt (Tab. 35). Bei den neun beweglichen Stämmen (Nr.618 bis 728), die zwischen der ersten und der zweiten Vakzinierung isoliert wurden, konnte eine Typisierung des H-Antigens vorgenommen werden. Bei den O83-Stämmen (Nr.618 bis 627), zwei Rauhformen (Nr.649a und 728) und bei einem nicht O-typisierbaren Stamm (Nr.649b) konnte das H31-Antigen erhoben werden. Weiterhin wurde zwei Mal (Nr.682a und b) das H6-Antigen und ein Mal (Nr.707) das H16-Antigen ermittelt. Aufgrund begrenzter Antiseren konnte bei 19 Stämmen keine Bestimmung des H-Antigens vorgenommen werden.

Bei der überwiegenden Zahl der Stämme war das Kapselantigen nicht typisierbar (Tab. 35). Die ersten beiden O83-Stämme (Nr.11341 und 599), die vor und während der ersten Vakzinierung isoliert wurden, sowie bei den unter der zweiten Vakzinierung erhobenen O18-Stämmen (Nr.780 bis 797) und einem nach der zweiten Vakzinierung isolierten O18-Stamm (Nr.835) konnte das K1-Antigen typisiert werden. Die in den folgenden vier Jahren bis zur vierten Vakzinierung aufgetretenen Stämme hatten alle ein nicht typisierbares Kapselantigen. Bei dem dann isolierten vierten Vakzinestamm (Nr.1212) konnte das K5-Antigen typisiert werden.

Eine Gesamtübersicht der zahlreichen Daten (Serovar, Biochemotyp, Genotyp) zeigt Tab. 35 und Tab. 36. Die Vakzineapplikationen und die Auswahl der Stämme zur Autovakzineherstellung sind rot dargestellt. Stoffwechselleistungen von besonderer Bedeutung für die Stammcharakterisierung sind in der Tab. 36 orange unterlegt.

Tab. 35: Probenahmedaten, Serovare, Biochemotypen und Genotypen der *E.coli*-Isolate der Patientin 11

9172	17.06.1988	>10 ⁵	O 8 H n.t. K n.t.		
11341	29.07.1988	1 Kol	O 83 H- K 1	1776	A1
597	03.10.1988	steril			
599	04.10.1988	1 Kol	O 83 H- K 1	1772	A2
601	12.10.1988	steril			
602	18.10.1988	1 Kol			
618	27.01.1989	>10 ⁵	O 83 H 31 K n.t.	1776	B
625	17.02.1989	>10 ⁵	O 83 H 31 K n.t.	5776	B
627	27.02.1989	>10 ⁵	O 83 H 31 K n.t.	7776	C
649a	28.04.1989	>10 ⁵	O RF H 31 K n.t.	7776	B
649b	28.04.1989	>10 ⁵	O n.t. H 31 K n.t.	7776	B
682a	12.09.1989	>10 ⁵	O n.t. H 6 K n.t.	3774	D1
682b	12.09.1989	>10 ⁵	O RF H 6 K n.t.	3774	D2
707	14.11.1989	>10 ⁵	O RF H 16 K n.t.	3774	E
728	12.02.1990	1x10 ¹	O RF H 31 K n.t.	7777	F
749	06.03.1990	steril			
765	03.04.1990	steril			
772	30.04.1990	steril			
780	16.05.1990	>10 ⁵	O 18 H- K 1	3716	G1
787	11.06.1990	>10 ⁵	O 18 H- K 1	3716	G2
797	18.07.1990	>10 ⁵	O 18 H- K 1	3716	G1
802	29.08.1990	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	3712	G3
816	02.10.1990	>10 ⁵	O 18 H- K n.t.	3716	G1
835	12.11.1990	>10 ⁵	O 18 H- K 1	3712	G4
842	28.11.1990	>10 ⁵	O RF H n.t. K n.t.	1676	H
845	05.12.1990	>10 ⁵	O n.t. H n.t. K n.t.	1676	I
858	06.02.1991	>10 ⁵	O 23 H n.t. K n.t.	3676	J1
881	17.04.1991	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	3676	K
893	22.05.1991	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	3676	L
902	07.08.1991	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	3676	M
920	09.10.1991	>10 ⁵	O 23 H n.t. K n.t.	3676	N
944	08.01.1992	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	3676	J2
977	08.04.1992	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	3676	O
1017	15.07.1992	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	3676	P1
1051a	21.10.1992	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	3676	Q
1051b	21.10.1992	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	3676	R
1066	25.11.1992	>10 ⁵	O 14 H- K n.t.	3676	P1
1084	20.01.1993	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	3676	P1
1114	21.04.1993	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	3676	S
1126	26.05.1993	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	3676	P1
1128	09.06.1993	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	3676	P2
1131	16.06.1993	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	3676	P1
1134	23.06.1993	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	3676	P3
1138	30.06.1993	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	3676	T
1141a	07.07.1993	>10 ⁵	O RF H+ K n.t.	3676	U1
1141b	07.07.1993	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	3676	V1
1144	14.07.1993	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	3676	U2
1148a	30.07.1993	>10 ⁵	O 14 H- K n.t.	3676	V2
1148b	30.07.1993	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	3676	U3
1152a	01.09.1993	>10 ⁵	O 14 H- K n.t.	3676	U4
1152b	01.09.1993	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	3676	U5
1165a	01.12.1993	>10 ⁵	O 14 H- K n.t.	3676	U6
1165b	01.12.1993	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	3676	U7
1176	23.02.1994	>10 ⁵	O 14 H- K n.t.	3676	U8
1192	08.06.1994	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	3676	W
1199	17.08.1994	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	3676	U9
1212	18.11.1994	>10 ⁵	O RF H+ K 5	3711	X
1229	23.02.1995	steril			
1232	02.03.1995	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	3711	X
1238	09.03.1995	steril			
1242	16.03.1995	steril			
1246	23.03.1995	steril			
1250	30.03.1995	steril			
1306	15.01.1996	>10 ⁵	O 21 H+ K n.t.	3701	Y
1341	21.08.1996	steril			

Legende: n.t.: nicht typisierbar; RF: Rauhform; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm

Tab. 36: Biochemotypisierungsergebnisse zu den *E. coli*-Isolaten der Patientin 11

Stammnummer	Isolierungsdat.	Keimzahl / ml Urinprobe	Serovare	Hämolysebildung	Glycerol	Laktose	Lysin	Indol	Ornithin	Raffinose	Saccharose	Rhamnose	Dulcitol	Sorbitose	Salicin	Biochemotypen	Genotypen
11341	29.07.1988	1Kd	O 83 H- K1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1776	A1
599	04.10.1988	1Kd	O 83 H- K1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	1772	A2
618	27.01.1989	>10 ⁵	O 83 H 31 K n.t.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1776	B
625	17.02.1989	>10 ⁵	O 83 H 31 K n.t.	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	5776	B
627	27.02.1989	>10 ⁵	O 83 H 31 K n.t.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	7776	C
649a	28.04.1989	>10 ⁵	O RF H 31 K n.t.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	7776	B
649b	28.04.1989	>10 ⁵	O n.t. H 31 K n.t.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	7776	B
682a	12.09.1989	>10 ⁵	O n.t. H 6 K n.t.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	3774	D1
682b	12.09.1989	>10 ⁵	O RF H 6 K n.t.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	3774	D2
707	14.11.1989	>10 ⁵	O RF H 16 K n.t.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	3774	E
728	12.02.1990	1x10 ¹	O RF H 31 K n.t.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	7777	F
780	16.05.1990	>10 ⁵	O 18 H- K 1	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	3716	G1
787	11.06.1990	>10 ⁵	O 18 H- K 1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	3716	G2
797	18.07.1990	>10 ⁵	O 18 H- K 1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	3716	G1
802	29.08.1990	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	3712	G3
816	02.10.1990	>10 ⁵	O 18 H- K n.t.	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	3716	G1
835	12.11.1990	>10 ⁵	O 18 H- K 1	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	3712	G4
842	28.11.1990	>10 ⁵	O RF H n.t. K n.t.	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	1676	H
845	05.12.1990	>10 ⁵	O n.t. H n.t. K n.t.	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	1676	I
858	06.02.1991	>10 ⁵	O 23 H n.t. K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	J1
881	17.04.1991	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	K
893	22.05.1991	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	L
902	07.08.1991	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	M
920	09.10.1991	>10 ⁵	O 23 H n.t. K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	N
944	08.01.1992	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	J2
977	08.04.1992	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	O
1017	15.07.1992	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	P1
1051a	21.10.1992	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	Q
1051b	21.10.1992	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	R
1066	25.11.1992	>10 ⁵	O 14 H- K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	P1
1084	20.01.1993	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	P1
1114	21.04.1993	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	S
1126	26.05.1993	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	P1
1128	09.06.1993	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	P2
1131	16.06.1993	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	P1
1134	23.06.1993	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	P3
1138	30.06.1993	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	T
1141a	07.07.1993	>10 ⁵	O RF H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	U1
1141b	07.07.1993	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	V1
1144	14.07.1993	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	U2
1148a	30.07.1993	>10 ⁵	O 14 H- K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	V2
1148b	30.07.1993	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	U3
1152a	01.09.1993	>10 ⁵	O 14 H- K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	U4
1152b	01.09.1993	>10 ⁵	O RF H- K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	U5
1165a	01.12.1993	>10 ⁵	O 14 H- K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	U6
1165b	01.12.1993	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	U7
1176	23.02.1994	>10 ⁵	O 14 H- K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	U8
1192	08.06.1994	>10 ⁵	O 14 H+ K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	W
1199	17.08.1994	>10 ⁵	O n.t. H- K n.t.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	3676	U9
1212	18.11.1994	>10 ⁵	O RF H+ K 5	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	3711	X
1232	02.03.1995	>10 ⁵	O n.t. H+ K n.t.	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	3711	X
1306	15.01.1996	>10 ⁵	O 21 H+ K n.t.	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	3701	Y
Codetriplets				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1		

Legende: n.t.: nicht typisierbar; RF: Rauhform; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm
 (+) positive Reaktion – im Codetriplett mit 1, 2 bzw. 4 bewertet
 (-) negative Reaktion – im Codetriplett mit 0 bewertet
 Farbrunterlegung: abweichende Reaktionen, die zu geringfügigen Änderungen des biochemischen Codes führen

Nach der Biochemotypisierung wurden 12 Biochemotypen ermittelt. Die überwiegende Anzahl der Stämme (Nr.858 bis 1199) wurde durch den Biochemotyp 3676 und zwei weitere Stämme (Nr.842 und 845) durch den ähnlichen Biochemotyp 1676 charakterisiert. Die Stämme 842 und 845 konnten im Gegensatz zu allen weiteren Stämmen mit dem Biochemotyp 3676 kein Glycerol fermentieren (Tab. 36, orange unterlegt).

Die Stämme (Nr.842 bis 1199) wurden erstmals zwischen der zweiten und dritten Vakzinierung isoliert. Sie blieben während der gesamten dritten Vakzinierung und darüber hinaus bis zur Isolierung des vierten Vakzinestammes über einen Zeitraum von ca. vier Jahren nachweisbar (Tab. 35).

Die O83-Stämme (Nr.11341 bis 627) sowie die beiden Rauhformen (Nr.649a und 728) und der nicht O-typisierbare Stamm (Nr.649b) mit dem H31-Antigen waren durch ähnliche bzw. identische Biochemotypen charakterisiert. Dabei nahmen die Stoffwechselleistungen im zeitlichen Verlauf zu. Der Stamm 599, der unter der ersten Vakzinierung isoliert wurde, war der Stamm mit den geringsten Stoffwechselleistungen. Während die Stämme 11341, 599 und 618 Hämolyse negativ waren und Glycerol nicht fermentieren konnten, fehlte dem Stamm 599 zusätzlich das Fermentationsvermögen für Dulcitol (Tab. 36, orange unterlegt). Die anderen Stämme waren Hämolyse positiv und konnten ab dem Stamm 627 auch Glycerol abbauen. Der Stamm 728 konnte zusätzlich Salicin abbauen und wurde damit positiv in allen überprüften Stoffwechseleigenschaften (Tab. 36, orange unterlegt).

In der Zeit zwischen erster und zweiter Vakzinierung wurden nacheinander drei weitere Stämme (Nr.682a und b und 707) mit identischem Biochemotyp (Biochemotyp 3774) isoliert. Die Stämme 682a und b, aus derselben Urinprobe isoliert, waren durch das H6-Antigen charakterisiert, während der Stamm 707 das H16-Antigen trug (Tab. 35, Tab. 36).

Bei sechs Stämmen (Nr. 780 bis 835), die nach der zweiten Vakzinierung isoliert wurden, konnten die ähnlichen Biochemotypen 3716 und 3712 erhoben werden (Tab. 35, Tab. 36). Zwei Stämme (Nr.802 und 835) konnten im Gegensatz zu den anderen kein Dulcitol fermentieren (Tab. 36, orange unterlegt).

Der vierte Vakzinestamm (Nr.1212) und der unter der vierten Vakzinierung erhobene Stamm 1232, eine nicht O-typisierbare Form, waren durch den gleichen Biochemotyp 3711 charakterisiert. Der fast ein Jahr später isolierte O21-Stamm hatte den ähnlichen Biochemotyp 3701 (Tab. 35, Tab. 36). Er konnte keine Rhamnose mehr fermentieren, war aber in den übrigen Stoffwechseleigenschaften mit den Stämmen 1212 und 1232 identisch (Tab. 36, orange unterlegt).

Nach Auswertung der Restriktionsmuster wurden 25 Genotypen ermittelt (Abb. 12). Die O83-Stämme 11341 und 599 gehörten zum Genotyp A. Aufgrund der Differenz eines Fragmentes erfolgte die Subtypisierung in A1 und A2.

Mit Ausnahme des Stammes 627, der dem Genotyp C zugeordnet wurde, gehörten die nach der ersten Vakzinierung isolierten O83-Stämme sowie die Stämme 649a und b zum Genotyp B. Der Stamm 728, der auch durch das H31-Antigen charakterisiert war und einen ähnlichen Biochemotyp hatte, gehörte zum Genotyp F.

Die Stämme 682a und b wurden dem Genotyp D1 und D2 zugeordnet, während der Stamm 707 dem Genotyp E entsprach. Bei identischem Biochemotyp 3774 wurde bei den Stämmen 682a und b das H6-Antigen ermittelt und bei dem Stamm 707 das H16-Antigen.

Die fünf O18-Stämme (Nr.780 bis 797, 816 und 835) sowie der nicht O-typisierbare Stamm 802 wurden als Genotyp G typisiert, der aufgrund von Differenzen von bis zu zwei Fragmenten in G1 bis G4 subtypisiert wurde.

Die Stämme 842 bis 1199 mit ähnlichen bzw. identischen Biochemotypen 1676 bzw. 3676 wurden den Genotypen H bis W zugeordnet. Die Stämme 842 bis 1199 hatten dabei ein ähnliches Grundmuster, wichen aber teilweise in mehr als drei Fragmenten voneinander ab. Aufgrund der Differenz von bis zu drei Banden erfolgte eine Subtypisierung der Genotypen J in J1 und J2, P in P1 bis P3, U in U1 bis U9 und V in V1 und V2.

Der vierte Vakzinestamm 1212 wurde dem Genotyp X zugeordnet und stimmte sowohl biochemotypisch als auch genotypisch mit dem unter der vierten Vakzinierung isolierten Stamm 1232 überein.

Der letzte Stamm 1306, eine O21-Serovar mit dem ähnlichen Biochemotyp 3701, hatte ein eigenes Restriktionsmuster und wurde dem Genotyp Y zugeordnet.

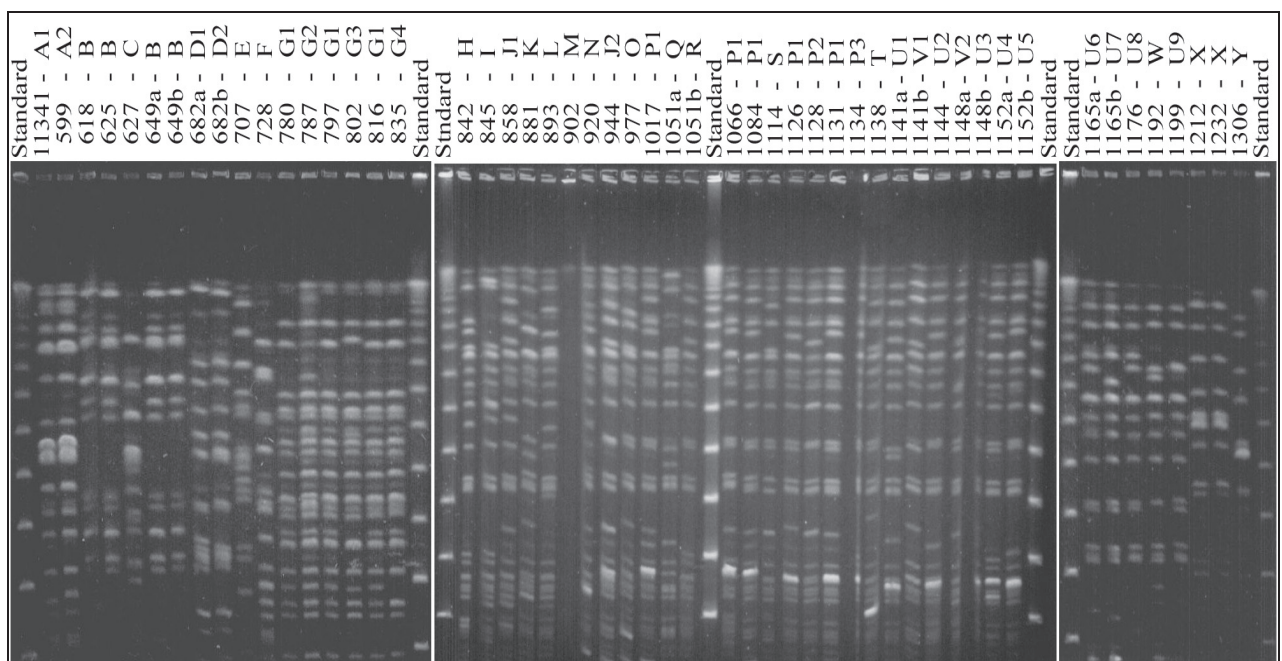


Abb. 12: Restriktionsmuster der genomischen DNA der *E. coli*-Stämme der Patientin 11 nach *Xba*I-Verdau und Auftrennung der Fragmente mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese

4.12 Patient 12

Bei Patient 12, 59 Jahre bei Beobachtungsbeginn, war seit 1975 eine chronisch rezidivierende Pyelonephritis, hervorgerufen durch *E. coli*, bekannt. In der Anamnese war eine Nephrolithiasis zu erheben. Der Patient befand sich seit 1978 in der nephrologischen Ambulanz der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock in Behandlung. Während akuter Exazerbationen wurde der Patient stationär behandelt. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über eine Zeit von sieben Jahren und zehn Monaten.

4.12.1 Vakzinierung

In dem Beobachtungszeitraum von sieben Jahren und zehn Monaten wurden vier Vakzinierungen vorgenommen. In Tab. 37 sind die Vakzinierungsdaten beschrieben.

Tab. 37: Übersicht der Vakzinetherapien des Patienten 12

	Anzahl der Applikationen	Vakzinestammnr.	Vakzineserotypen	Biochemotypen	Genotypen	Vakzinierungszeiträume
1. Vakzinierung	3	603	O6 : H1 : K2	5710	A1	06.12.1988-20.12.1989
2. Vakzinierung	3	713	O6 : H1 : K2	5710	A2	03.04.1990-21.05.1990
3. Vakzinierung	6	892	O6 : H1 : K n.t.	5710	A3	22.04.1992-27.05.1992
4. Vakzinierung	6	1226	ORF : H+ : K n.t.	5710	A3	17.05.1995-21.06.1995

Legende: n.t.: nicht typisierbar; RF: Rauhform; H+: beweglicher Stamm

Während der ersten zwei Vakzinierungen erhielt der Patient jeweils drei Applikationen. Der erste Vakzinierungszyklus erfolgte im Abstand von einem Monat und der zweite im wöchentlichen Abstand. Die dritte und vierte Vakzinierung wurde mit jeweils sechs Applikationen im wöchentlichen Abstand durchgeführt.

Die ersten beiden Vakzinierungen wurden mit serotypisch identischen Stämmen vorgenommen (Serotyp O6:H1:K2). Bei dem dritten Vakzinestamm war das Kapselantigen nicht typisierbar. Die vierte Vakzinierung wurde mit einer beweglichen Rauhform durchgeführt, bei der das Kapselantigen ebenfalls nicht typisierbar war.

Der Biochemotyp aller Vakzinestämme war 5710. Genotypisch gehörten die Vakzinestämme zum Genotyp A1 bis A3. Der dritte und vierte Stamm waren genotypisch identisch. Die Vakzinierungszeiträume sind der Tab. 37 zu entnehmen.

4.12.2 Bakterienstammcharakterisierung

Bei Patient 12 wurden im Beobachtungszeitraum acht Stämme isoliert (Tab. 38). Bis auf den Stamm 1226, der als Rauhform vorlag, gehörten alle anderen Stämme zur O6-Serovar. Die Stämme waren alle beweglich, wobei zu Beginn des Beobachtungszeitraumes bei den Stämmen 603 bis 892 das H1-Antigen ermittelt werden konnte. Das Kapselantigen K2 war bis zum Abschluss der zweiten Vakzinierung nachweisbar (Nr.: 603, 713 und 781). Im weiteren Verlauf war die O : H : K-Serovar nicht mehr vollständig zu erheben, da bei den folgenden Stämmen ein nicht typisierbares Kapselantigen vorlag.

Tab. 38: Probenahmedaten, Serovare, Biochemotypen und Genotypen der *E. coli*-Isolate des Patienten 12

Stamnummer	Probeneingangsdatum	Keimzahl / ml Urinprobe	Serovare	Biochemotypen	Genotypen
603	18.10.1988	>10 ⁵	O 6 H 1 K 2	5710	A1
610	06.12.1988	steril			
613	13.12.1988	steril			
614	20.12.1988	steril			
713	29.11.1989	>10 ⁵	O 6 H 1 K 2	5710	A2
764	03.04.1990	steril			
770	27.04.1990	steril			
781	21.05.1990	>10 ⁵	O 6 H 1 K 2	5710	A3
811	18.09.1990	steril			
860	21.02.1991	>10 ⁵	O 6 H 1 K n.t.	5710	A3
892	22.05.1991	6x10 ⁴	O 6 H 1 K n.t.	5710	A3
960	19.02.1992	>10 ⁵	O 6 H+ K n.t.	5710	A3
984	22.04.1992	steril			
2IIIb	29.04.1992	steril			
2IIIc	06.05.1992	steril			
992	13.05.1992	steril			
997	20.05.1992	steril			
999	27.05.1992	steril			
1226	15.02.1995	>10 ⁵	O RF H+ K n.t.	5710	A3
1261	17.05.1995	steril			
1263	24.05.1995	steril			
1264	31.05.1995	steril			
1266	07.06.1995	steril			
1268	14.06.1995	steril			
1272	21.06.1995	steril			
1322	17.04.1996	>10 ⁵	O 6 H+ K n.t.	7756	A3
1343	21.08.1996	steril			

Legende: n.t.: nicht typisierbar; RF: Rauhform; H+: beweglicher Stamm; H-: unbeweglicher Stamm

Im Ergebnis der Biochemotypisierung sind sieben Stämme durch den Biochemotyp 5710 charakterisiert (Nr.: 603, 713, 781, 860, 892, 960 und 1226). Der letzte Stamm (Nr. 1322) ist durch den Biochemotyp 7756 gekennzeichnet (Tab. 39).

Während die Rauform (Nr.1226) in Biochemotyp und Genotyp mit den zuvor isolierten Stämmen (Nr. 781, 860, 892 und 960) identisch war, zeichnete sich der Stamm 1322 durch eine mit diesen Stämmen gleiche Serovar und einen identischen Genotyp aus. Der Stamm 1322 unterschied sich jedoch durch mehr positive Stoffwechselreaktionen von allen anderen Stämmen und wurde so durch den abweichenden biochemischen Code 7756 charakterisiert. Er konnte zusätzlich Glycerol, Raffinose, Dulcitol und Sorbose fermentieren (Tab. 39, orange unterlegt).

Tab. 39: Biochemotypisierungsergebnisse zu den *E. coli*-Isolaten des Patienten 12

Stamnummer	Isolierungsdatum	Keimzahl /ml Urinprobe	Serovare	Hämolysinbildung	Fermentation von											Biochemotypen	Genotypen
					Glycerol	Laktose	Lysin	Indol	Ornithin	Raffinose	Saccharose	Rhamnose	Dulcitol	Sorbose	Salicin		
603	18.10.1988	>10 ⁵	O 6 H 1 K 2	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	5710	A1
713	29.11.1989	>10 ⁵	O 6 H 1 K 2	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	5710	A2
781	21.05.1990	>10 ⁵	O 6 H 1 K 2	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	5710	A3
860	21.02.1991	>10 ⁵	O 6 H 1 K n.t.	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	5710	A3
892	22.05.1991	>10 ⁵	O 6 H 1 K n.t.	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	5710	A3
960	19.02.1992	>10 ⁵	O 6 H+ K n.t.	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	5710	A3
1226	15.02.1995	>10 ⁵	O RF H+ K n.t.	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	5710	A3
1322	17.04.1996	>10 ⁵	O 6 H+ K n.t.	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	7756	A3
Codetriplets				4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1		

Legende: n.t.: nicht typisierbar; RF: Rauform; H+: beweglicher Stamm
 (+) positive Reaktion – im Codetriplett mit 1, 2 bzw. 4 bewertet
 (-) negative Reaktion – im Codetriplett mit 0 bewertet
 Farbung: abweichende Reaktionen, die zu geringfügigen Änderungen des biochemischen Codes führen

Nach Auswertung der Restriktionsmuster wurden die acht Stämme dem Genotyp A zugeordnet, der aufgrund einer Differenz von zwei Banden in die Subtypen A1 bis A3 unterteilt wurde. Während der erste Vakzinestamm 603 dem Genotyp A1 und der zweite Vakzinestamm 713 dem Genotyp A2 zugeordnet wurden, gehörten ab dem Stamm 781, der unter der zweiten Vakzinierung isoliert wurde, alle Stämme zum Genotyp A3. Wie aus der Abb. 13 ersichtlich, sind die Rauhform (Nr.1226) und der Stamm 1322 mit dem abweichenden Biochemotyp genotypisch identisch mit den vorher isolierten Stämmen 781 bis 960.

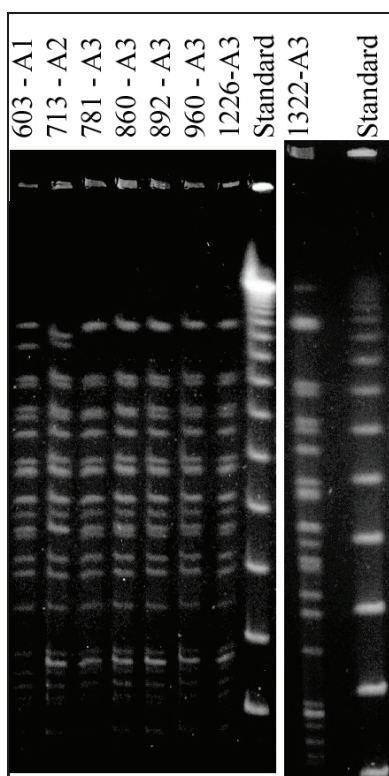


Abb. 13: Restriktionsmuster der genomischen DNA der *E. coli*-Stämme des Patienten 12 nach XbaI-Verdau und Auftrennung der Fragmente mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese

4.13 Zusammenfassender Vergleich einzelner Patientenergebnisse untereinander

4.13.1 Vorkommen verschiedener O-Serovare und Korrelation mit dem Biochemo- und Genotyp

Während die O-Serovare 17, 18, 24 und 39 immer nur bei einem Patienten festgestellt werden konnten, kamen die O-Serovare 1, 2, 6, 9, 14, 75, und 83 bei mehreren Patienten vor. Dennoch hatte jeder Patient seine individuellen Stämme, die trotz derselben O-Serovar nicht identisch waren mit den Stämmen derselben O-Serovar anderer Patienten. Innerhalb eines Patienten zeichneten sich die O-Serovare oft durch identische oder sehr ähnliche Biochemotypen aus. Die Biochemotypen von Stämmen derselben O-Serovar von verschiedenen Patienten differierten. So waren die Stämme der O1-Serovar der Patientin 2 (Tab. 9, S. 39) durch den Biochemotyp 1674 und die der Patientin 8 (Tab. 27, S. 62) durch die Biochemotypen 1710 und 1610 gekennzeichnet. Bei den Stämmen der O2-Serovar der Patientin 4 (Tab. 15, S. 47) war der Biochemotyp 3717, bei der Patientin 7 (Tab. 24, S. 58) waren die Biochemotypen 5712 und 5716 und bei der Patientin 9 (Tab. 30, S. 66) war der Biochemotyp 1756 festzustellen.

Die Ergebnisse der Sero-, der Biochemo- und der Genotypisierung korrelierten überwiegend gut miteinander, wie z.B. bei den Patienten 1 (Tab. 5, S. 34), 4 (Tab. 14, S. 46), 5 (Tab. 17, S. 50), 7 (Tab. 23, S. 56), 10 (Tab. 32, S. 69) und 12 (Tab. 38, S. 80). Durch die Kombination der Typisierungsmethoden konnte ein höheres Diskriminierungsvermögen erzielt werden. Mit Hilfe der Genotypisierung wurden Stämme einer Serovar mit identischem oder ähnlichem Biochemotyp oft weiter subdifferenziert wie z.B. die Stämme der O6-Serovar des Patienten 12 (Tab. 38, S. 80). Hier konnten die Subtypen A1 – A3 festgestellt werden.

Andererseits waren aber die Biochemotypen der Stämme der Patienten 3 (Tab. 11, S. 42), 6 (Tab. 20, S. 53) und 11 (Tab. 35, S. 75) entweder so variabel oder so ähnlich, dass keine Feindifferenzierung durch die Biochemotypisierung erfolgen konnte. So waren unter den O14-Stämmen der Patientin 11 (Tab. 35, S. 75) mit dem Biochemotyp 3676 sieben verschiedene Genotypen festzustellen und weitere Subtypen. Bei der Patientin 8 (Tab. 26, S. 61) korrelierten zwar Sero- und Biochemotypisierung, die Auswertung der sehr ähnlichen Fragmentmuster war aber aufgrund der hohen Anzahl der Stämme schwierig.

4.13.2 Zuordnung von nicht O-typisierbaren Stämmen und Rauhformen mit Hilfe der Biochemo- und Genotypisierung

Aufgrund identischer bzw. sehr ähnlicher Biochemo- bzw. Genotypen war die Zuordnung von fast einem Viertel der nicht O-typisierbaren Stämme und Rauhformen zu O-typisierbaren Stämmen der jeweiligen Patienten möglich. Es handelte sich dabei um 10 nicht O-typisierbare Stämme und 11 Rauhformen. In Tab. 40 sind diese Stämme mit der O-Serovar sowie den Genotypen und ermittelten Biochemotypen aufgeführt.

Tab. 40: Serotypische Zuordnung der O n.t.- und Rauhformen mit vorkommenden Biochemotypen innerhalb der wahrscheinlichen Genotypen

	Anzahl O n.t.- Stämme	Anzahl O RF- Stämme	Ermittelte Biochemotypen innerhalb des betreffenden Genotyps	Genotyp	Rückschluss auf nahe liegende O-Serovar	Abb.- und Seiten- verweis
Pat. 1	6		3611	B1 – B4	O14	Tab. 5, S.34, Abb. 2, S.36
Pat. 4	1		3717	B	O2	Tab. 14, S.46 Abb. 5, S.48
Pat. 5		1	3772, 7772	B	O39	Tab. 17, S.50 Abb. 6, S.51
Pat. 7		5	5712, 5716	A1, A2	O2	Tab. 23, S.56 Abb. 8, S.59
		1	7777, 7776	J	O75	
Pat. 10	1	2	3777, 1677, 7677, 7777, 7737	C1 – C6	O6/24	Tab. 32, S.69 Abb. 11, S.71
Pat. 11	1	1	1776, 5776, 7776	B	O83	Tab. 35, S.75 Abb. 12, S.78
	1		3712, 3716	G1 – G4	O18	
Pat. 12		1	5710, 7756	A1 – A3	O6	Tab. 38, S.80 Abb. 13, S.82

Legende: n.t. nicht typisierbar; RF: Rauhform

Bei den Patienten 1, 4 und 12 waren die nicht typisierbaren Stämme und Rauhformen durch den gleichen Biochemotyp wie die O-typisierbaren Stämme gekennzeichnet. Bei den Patienten 5, 7 und 11 (eine O n.t.-Form, die der O18-Serovar zugeordnet wurde) wurden innerhalb eines Genotyps jeweils zwei Biochemotypen ermittelt. Dabei wichen diese immer nur durch eine Stoffwechselreaktion voneinander ab.

Bei einem weiteren nicht typisierbaren Stamm und einer Rauhform der Patientin 11, die der O83-Serovar zuzuordnen waren, gab es drei verschiedene Biochemotypen innerhalb des

Genotyps B. Während der erste Stamm Hämolysin und Glycerol negativ war, entwickelten die folgenden Stämme schrittweise zunächst das Hämolysevermögen und die Fermentation von Glycerol. Die Rauform und der nicht typisierbare Stamm waren dabei die mit den meisten Stoffwechselleistungen (Tab. 36, S.76).

Bei der Patientin 10 wurden innerhalb der Serotypen O6/O24 vier verschiedene Biochemotypen erhoben. Auch hier war eine Entwicklung von weniger zu mehr Stoffwechselleistung im Verlauf der Zeit zu verzeichnen. Die nicht typisierbaren Stämme und Rauformen waren erneut durch die meisten positiven Stoffwechselreaktionen gekennzeichnet (Tab. 33, S.70).

Weiterhin konnte mit Hilfe der Biochemotypisierung und der Genotypisierung auch auf eine Verwandtschaft von O n.t.-Stämmen und Rauformen untereinander geschlossen werden (Tab. 41).

Tab. 41: O n.t.- und O RF-Stämme, die untereinander zugeordnet wurden

	Stammnr.	O-Serovar	Biochemotyp	Genotyp
Pat. 1	1203	O n.t.	3776	D1
	1205	O n.t.	3756	D2
Pat. 2	711	O n.t.	3737	C
	714	O n.t.	3717	C
Pat. 7	813	O n.t.	1611	G
	815	O n.t.	1611	G
	817	O n.t.	1611	G
	824	O n.t.	1611	G
Pat. 11	682a	O n.t.	3774	D1
	682b	O RF	3774	D2
	1212	O RF	3711	X
	1232	O n.t.	3711	X

Legende: n.t. nicht typisierbar; RF: Rauform

Bei den Patienten 1 und 2 sind die in der Tab. 41 aufgeführten Stämme durch Biochemotypen charakterisiert, die untereinander jeweils nur in einer Reaktion voneinander abwichen. Die Stämme der Patienten 7 und 11 waren durch identische Biochemotypen gekennzeichnet. So konnte durch Ermittlung des Biochemotyps schon vermutet werden, dass es sich bei diesen Stämmen um gleiche *E. coli*-Stämme handeln würde. Durch die Genotypisierung konnte diese Vermutung bestätigt werden.

4.13.3 Auswertung der Rezidive und Reinfektionen bei den einzelnen Patienten

Als Rezidiv wurde in der Arbeit die erneute Harnwegsinfektion mit dem serotypisch, biochemotypisch und genotypisch identischen *E. coli*-Stamm gewertet. Um eine Reinfektion handelte es sich, wenn bei der nächsten Harnwegsinfektion ein genotypisch anderer *E. coli*-Stamm identifiziert wurde. Der Sero- und Biochemotyp konnten identisch oder verschieden sein.

Zeiten, in denen bei den Patienten eine permanente Bakteriurie vorlag, fanden keine Berücksichtigung, da hier zwischen einem Rezidiv und einer Reinfektion nicht unterschieden werden konnte.

Tab. 42: Anzahl der Rezidive und Reinfektionen nach Genotypisierung

Patient	1*	2	3	4*	5*	6	7*	8	9	10*	11*	12
Rezidiv	0	2	1	3	2	0	0	p. b.	1	4	2	7
Reinfektion	5	5	7	1	1	3	10	p. b.	9	3	8	0

* : Patienten mit Zeiten permanent positiver Urinkulturen, die keine Berücksichtigung fanden

p. b.: Patientin 8 mit permanenter Bakteriurie

Bei sechs von zwölf Patienten gab es während des Beobachtungszeitraumes Zeiten mit einer permanenten Bakteriurie, d.h. es gab zwischen zwei positiven Urinkulturen keine sterile Urinkultur.

Bei der Patientin 8 (Tab. 26) lagen bis zur zweiten Vakzinierung permanent positive Urinkulturen vor. Erst mit der zweiten Vakzinierung war kein weiteres Rezidiv mehr aufgetreten. Der Beobachtungszeitraum endete aber nach der zweiten Vakzinierung, so dass zum weiteren Verlauf und Erfolg der Vakzinierung keine Aussage getroffen werden konnte.

Insgesamt wurden 22 (29 %) bakteriologische Rezidive und 52 (70 %) Reinfektionen nachgewiesen.

4.13.4 Ergebnisse der Vakzinierungen

Insgesamt wurden bei den 12 Patienten 24 Vakzinierungen vorgenommen. Dabei erhielten die Patienten 1 bis 6 eine Vakzinierung, die Patienten sieben und acht zwei Vakzinierungen, die Patienten neun und zehn drei Vakzinierungen und die Patienten elf und zwölf vier Vakzinierungen (Tab. 43). Von zwei Vakzinestämmen konnten keine Genotypen ermittelt werden (Patientin 9 (Tab. 29, S.65) und Patientin 11 (Tab. 35, S.75)). Im Anschluss an die 2. Vakzinierung bei Patientin 8 (Tab. 26 S.61) endete der Beobachtungszeitraum, so dass keine weiteren Verlaufsdaten bekannt sind. Bei Patientin 5 wurde die Vakzinierung aufgrund einer Harnwegsinfektion abgebrochen. So konnten 20 Vakzinierungen mit vollständiger Sero-, Biochemo- und Genotypisierung für die Auswertung berücksichtigt werden (Tab. 43).

Tab. 43: Übersicht über die Ergebnisse der Vakzinierungen

	1.Vakzinierung	2.Vakzinierung	3.Vakzinierung	4.Vakzinierung
Pat. 1	Vakzinestamm eliminiert			
Pat. 2	Vakzinestamm eliminiert			
Pat. 3	Vakzinestamm eliminiert			
Pat. 4	Vakzinestamm nicht eliminiert			
Pat. 5	Vakzinierung abgebrochen			
Pat. 6	Vakzinestamm eliminiert			
Pat. 7	Vakzinestamm eliminiert (1)	Vakzinestamm eliminiert		
Pat. 8	Vakzinestamm nicht eliminiert	Vakzinestamm eliminiert (2)		
Pat. 9	Vakzinestamm eliminiert	Vakzinestamm eliminiert	(3)	
Pat. 10	Vakzinestamm eliminiert	Vakzinestamm nicht eliminiert	Vakzinestamm eliminiert	
Pat. 11	(4)	Vakzinestamm eliminiert	Vakzinestamm eliminiert	Vakzinestamm eliminiert
Pat. 12	Vakzinestamm eliminiert	Vakzinestamm nicht eliminiert	Vakzinestamm eliminiert	Vakzinestamm eliminiert

- (1) Vakzinestamm war drei Wochen nach Abschluss der Vakzinierung noch einmalig nachweisbar
- (2) Vakzinestamm wahrscheinlich eliminiert, Beobachtungszeit endet mit Abschluss der Vakzinierung
- (3) Eliminierung des Vakzinestammes nicht beurteilbar, da Genotyp nicht bekannt
- (4) Eliminierung des Vakzinestammes nicht beurteilbar, da Genotyp und Biochemotyp nicht bekannt

Bei diesen 20 Vakzinierungen waren in 13 Fällen (65%) die Vakzinestämme bis zum Abschluss der Beobachtungszeit nicht wieder nachweisbar und somit eliminiert.

Bei Patientin 7 war der Vakzinestamm zwei Wochen nach Abschluss der Vakzinierung noch einmal in einer Keimzahlkonzentration von 10^5 / ml nachweisbar (Tab. 23, S.56). Der Vakzinestamm lag zu diesem Zeitpunkt als Rauhform vor. Nach dieser Episode war der Stamm bis zum Abschluss des Beobachtungszeitraumes nicht wieder nachweisbar und somit ebenfalls eliminiert.

Bei der Patientin 8 (Tab. 26, S.61) endete mit Abschluss der Vakzinierung der Beobachtungszeitraum, so dass keine Aussage über den weiteren Verlauf getroffen werden konnte. Jedoch war die Patientin bis zur zweiten Vakzinierung permanent bakteriurisch. Während der zweiten Vakzinierung waren die Urinproben steril, so dass sich hier eine Veränderung abzeichnete und der Vakzinestamm evt. eliminiert werden konnte.

Der Patient 12 konnte die Vakzinestämme immer nur vorübergehend eliminieren. Den Vakzinierungen folgten verschieden lange bis zu 2 Jahren und 9 Monaten währende, rezidivfreie Intervalle, in denen er sterile Urinkulturen aufwies. Letztlich erlitt der Patient dann erneut HWI mit einem *E. coli* derselben O-Serovar (Tab. 38, S.80). Die Vakzine wurde nach jedem längeren rezidivfreien Intervall aus dem aktuell aufgetretenen *E. coli*-Stamm neu hergestellt. Dieser Patient konnte nie endgültig saniert werden.

5 Diskussion

Die Harnwegsinfektion stellt eine Infektionskrankheit dar, die je nach klinischer Symptomatik beim ersten oder wiederholten Auftreten Anlass einer Antibiotikatherapie ist. Die akuten Infektionen sind gut therapierbar. Hinsichtlich der rezidivierenden HWI ist die antibiotische Therapie jedoch nicht ausreichend effektiv – unabhängig davon, ob es sich um ein klinisches Rezidiv, d.h. eine Reinfektion mit einem neuen Bakterienstamm, oder um ein mikrobiologisches Rezidiv, d.h. eine Reinfektion mit dem zuvor nachgewiesenen Stamm, handelt. Die Autovakzinetherapie wird in einigen Publikationen als alternative Therapieform für die rezidivierenden Harnwegsinfektionen dargestellt. Weil dafür eine monovalente Vakzine verwendet wird, ist die Autovakzinetherapie insbesondere dann indiziert, wenn es sich bei den klinisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen auch um mikrobiologische Rezidive handelt. Die Differenzierung zwischen echten Rezidiven und Neuinfektionen ist also wichtig. Der Erfolg einer mikrobiologischen Differenzierung hängt maßgeblich vom Diskriminierungsvermögen und der Verlässlichkeit der angewandten Typisierungstechnik ab. Etablierte Typisierungstechniken für *E. coli*-Stämme umfassen serologische Methoden zur Erfassung von Oberflächen-, Kapsel- und Geißel-Antigenen sowie die Erfassung von Mustern biochemischer Funktionen bzw. Antibiotikaresistenzen und schließlich von genomischen Unterschieden durch Auftrennung von enzymatisch hergestellten Genomfragmenten in der Pulsfeld-Gelelektrophorese. Alle über einen Zeitraum von 9 Monaten bis 8 Jahren und 2 Monaten isolierten *E. coli*-Stämme von 12 Patienten mit rezidivierenden Harnwegsinfektionen wurden mit diesen Methoden untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Folgenden diskutiert.

Die O-Serotypisierung der 172 *E. coli*-Stämme wurde mit 31 monovalenten O-Antiseren durchgeführt. Dadurch konnten 56 % der *E. coli*-Stämme (96 Isolate) O-typisiert werden, was den in der Literatur angegebenen 44 % bis 55 % O-typisierbarer Stämme unter Verwendung von 24 bzw. 44 O-Antiseren entspricht (11,14,60,62). Nur mit einem erheblichen Mehraufwand bei Verwendung von 150 O-Antiseren erreichte Orskov eine O-Typisierbarkeit von 78,8 % (63).

Der Anteil der nicht typisierbaren Stämme in dieser Arbeit war mit 27 % (46 Stämme) deutlich geringer als der bei Nimmich, der 40 % von 215 Isolaten nicht typisieren konnte (60).

Die Typisierbarkeit von *E. coli*-Stämmen ist zum einen abhängig von der Anzahl der verwendeten O-Antiseren und zum anderen von der untersuchten Patientenklientel. Die höchste Rate an typisierbaren *E. coli*-Stämmen wird bei Patienten mit rezidivierenden Harnwegsinfektionen gefunden, weil diese häufig durch die typisch uropathogenen Stämme

der „Common Serogroups“ verursacht werden. Dazu zählen die O-Serovare O1, O2, O4, O6, O7, O8, O9, O11, O14, O18 O22, O25, O62, O75 und O83 (8,64,95). Bei akuten und asymptomatischen Harnwegsinfektionen scheint das Antigenspektrum breiter zu sein und der Anteil nicht typisierbarer Stämme liegt höher.

Zu den drei differentialdiagnostisch wichtigen Antigenen der serologischen Typisierung von *E. coli*-Stämmen gehören außer dem Oberflächen- oder O-Antigen, das Kapsel- oder K-Antigen und das Geißel- oder H-Antigen (40,42). Die Bestimmung der vollständigen Antigenformel ist jedoch sehr kosten- und zeitaufwendig. Vorhandene K-Antigene, die eine O-Typisierung verhindern, müssen durch Erhitzung der *E. coli*-Kulturen auf 120 °C zerstört werden, um das O-Antigen bestimmen zu können. H-Antigene sind oft zu schwach ausgebildet, so dass die *E. coli*-Stämme über mehrere halbfeste Nährmedien kultiviert werden müssen, um eine Bestimmung der dann besser ausgebildeten Geißelantigene zu ermöglichen. Dazu kommt, dass die Antigenseren nur in begrenztem Umfang kommerziell erhältlich sind.

In der vorliegenden Arbeit war lediglich bei fünf Stämmen der vollständige O:H:K-Serotyp zu ermitteln. Die Differenzierung von Rezidiv und Reinfektion und die Beurteilung des Erfolges der Autovakzination anhand der Eliminierung des Vakzinestammes waren somit durch die Serotypisierung nicht möglich.

Zur weiteren Differenzierung der *E. coli*-Stämme wurde zusätzlich zur Serotypisierung bei jedem Isolat eine Biochemotypisierung durchgeführt. Während durch die Serotypisierung nicht alle Stämme typisierbar waren, konnte durch die Biochemotypisierung von jedem Stamm ein Biochemotyp ermittelt werden. Dabei war das Diskriminierungsvermögen durch die Biochemotypisierung innerhalb einer O-Serovar von Patient zu Patient und auch bei den Stämmen eines Patienten sehr unterschiedlich. So konnte bei den Patienten 1, 4, 5, 8, 9 und 12 eine gute Feindiskriminierung der Stämme erzielt werden. Bei den Patienten 2, 7 und 10 war bei einem Teil der Stämme durch die Biochemotypisierung eine gute Feindiskriminierung möglich, aber bei anderen Stämmen dieser Patienten keine Differenzierung ersichtlich. Bei den Patienten 3, 6 und 11 war der Biochemotyp entweder so variabel oder so ähnlich, dass durch diese Methode eine Feindiskriminierung der Stämme nicht möglich war.

In der Literatur gilt die Methode der Biochemotypisierung als einfach durchzuführen, gut reproduzierbar und kostengünstig (13-15,17,62). Hinsichtlich der Anwendung der Methode in Kombination mit der Serotypisierung zur Feintypisierung und Identifizierung klonaler Varianten gibt es verschiedene Meinungen. Einige Autoren konnten durch die Sero- und Biochemotypisierung eine besonders feine Differenzierung von *E. coli*-Stämmen erreichen (13,15-17,62). Andere Autoren halten die Methode der Biochemotypisierung als weiterführende, feindifferenzierende Methode für ungeeignet, da sie nur unzureichend oder gar nicht mit anderen Gruppierungstechniken, z.B. mit der Serotypisierung, korreliert

(2,3,18,23). Insgesamt sind die Ergebnisse von der Struktur der untersuchten Stammpopulation abhängig. Während die Abgrenzung von klonalen Varianten innerhalb einer uniformen Stammpopulation, d.h. innerhalb einer Serovar, gut ist, so ist die Feintypisierung bei einer heterogenen Stammpopulation, d.h. bei nicht O-typisierbaren Stämmen oder verschiedenen Serovaren, aufgrund einer zu hohen Variabilität unzureichend (2,3).

Die Sero- und die Biochemotypisierung sind Methoden, welche die phänotypischen Eigenschaften der Stämme analysieren. Da Oberflächen-, Kapsel- und Geißelantigene chromosomal determiniert sind, zeichnen sie sich durch eine hohe Stabilität aus. Trotzdem werden von über Jahren auf Dorset-Ei-Nährböden gelagerten und dann erneut angezüchteten Kulturen Mutanten, wie z.B. Rauhformen, also *E. coli*-Stämme mit unvollständigen O-Seitenketten, isoliert (64). Auch für die meisten biochemotypischen Eigenschaften gilt die chromosomale Determinierung und damit hohe Stabilität und Reproduzierbarkeit. Einige Stoffwechseleigenschaften, wie z.B. die Fermentation von Saccharose, Rhamnose und Raffinose, sind eher klonal assoziiert und damit für eine Differenzierung klonaler Varianten geeignet. Andere Stoffwechselleistungen sind variabler und ungeeignet für die Feintypisierung (1,2,64).

Alternativ zur Biochemotypisierung wurde die Resistotypisierung, die auch eine phänotypisierende Methode ist, auf die Diskriminierungsfähigkeit überprüft. Aber auch diese Methode erbringt keine zuverlässigen Ergebnisse. Die Änderung von Resistenzmustern gegenüber Antibiotika kann lediglich als Indiz für einen Erregerwechsel gewertet werden und muss durch andere Untersuchungsmethoden verifiziert werden.

Wegen der Variabilität der Expression des Phänotyps werden die Typisierungstechniken, die auf der Analyse von Proteinen basieren in ihrer Aussagefähigkeit und Zuverlässigkeit hinsichtlich der klonalen Analyse in Frage gestellt (37). Serotypisierung und Biochemotypisierung dienen eher der Erregeridentifizierung und stellen einen Bezug zwischen bestimmten Stämmen und definierten Krankheiten her. Zur Beantwortung von Fragen der klonalen Zusammengehörigkeit sind Techniken, die auf der Analyse der bakteriellen DNA basieren, besser geeignet. Etabliert sind die RAPD (random amplified polymorphic DNA analysis), PFGE (Pulsfeld-Gelelektrophorese) und die Ribotypisierung. In vergleichenden Untersuchungen wurde die PFGE als eine sehr fein diskriminierende und sehr gut reproduzierbare Technik herausgestellt und kam in dieser Arbeit als genotypisierende Methode für die Erstellung der Restriktionsmuster zur Anwendung (7,49,69,70,78). Durch den Vergleich der Fragmentmuster untereinander konnte eine feinere Differenzierung der Stämme erreicht werden als mit der Sero- oder mit der Biochemotypisierung. Klonale Varianten, deren Vorhandensein durch die Sero- und Biochemotypisierung angenommen wurden, konnten bestätigt, ausgeschlossen oder überhaupt erst erkannt werden.

5.1 Vergleich der Übereinstimmung der Feindiskriminierung bei Kombination von Sero- und Biochemotypisierung und Sero- und Genotypisierung

Die Kombination von Sero- und Biochemotypisierung zur Feindifferenzierung von *E. coli*-Stämmen und Erkennung klonaler Varianten wird von vielen Autoren für unzureichend gehalten, weil diese Methoden auf der Analyse phänotypischer Eigenschaften basieren. In dieser Arbeit wurde zusätzlich zur Sero- und Biochemotypisierung das Genom aller *E. coli*-Stämme molekularbiologisch in der Pulsfeld-Gelelektrophorese untersucht und eine Genotypisierung durchgeführt. Dadurch wurde ein Vergleich der Feindiskriminierungsfähigkeit bei Kombination von Sero- und Biochemotypisierung und von Sero- und Genotypisierung möglich.

Außer bei Patientin 4, bei der die Stämme durch beide Typisierungskombinationen in gleicher Weise fein differenziert wurden, konnten bei allen anderen Patienten bessere Ergebnisse durch die Kombination von Sero- und Genotypisierung erreicht werden. Durch die Genotypisierung war die Detektion von klonalen Varianten, also Stämmen, die sich im Restriktionsmuster nur durch ein bis drei Fragmente unterscheiden, möglich (z.B. bei Patientin 1 Stämme 1015 – 1048). Es konnte aber auch der Nachweis erbracht werden, dass Stämme mit gleichem Biochemotyp nicht zwangsläufig zum gleichen Genotyp gehören (z.B. Patientin 2 Stämme 863 – 928b). Stämme mit nicht O-typisierbarem Antigen konnten durch die Sero- und Genotypisierung besser untereinander oder anderen O-typisierbaren Stämmen zugeordnet werden, als durch die Sero- und Biochemotypisierung (z.B. Stämme der Patientin 2, 3, 5, 6, 9, 10 und 11). Insbesondere bei den Patienten 3, 6 und 11 waren die Biochemotypen entweder so variabel oder einander so ähnlich, dass keine Feindifferenzierung durch die Kombination von Sero- und Biochemotypisierung möglich war.

Hingegen war die Interpretation der Restriktionsmuster der *E. coli*-Stämme von den Patienten 8 und 11 zum einen wegen sehr ähnlicher Restriktionsmuster und zum anderen wegen der großen Anzahl zu vergleichender Restriktionsmuster problematisch. Die Stämme der Patientin 8 waren durch den identischen Serotyp O1:H:K1 und zwei einander gleichenden Biochemotypen (1610 und 1710) gekennzeichnet. Im Restriktionsmuster waren neben einem einheitlichen Grundmuster zusätzlich verschiedene variable Fragmente zu sehen. Diese führten nach Anwendung der Auswertungskriterien nach Römling (74) zur Differenzierung in zwei Genotypen und verschiedene Subtypen. Es handelt sich bei den Stämmen der Patientin 8 aber viel eher um einen *E. coli*-Stamm mit verschiedenen klonalen Varianten. Die hier zu Grunde gelegten Auswertungskriterien sind für diese Aussage zu eng bemessen.

Von den 30 *E. coli*-Stämmen der Patientin 11 (Stämme 858 – 1199), mit dem identischen Biochemotyp 3676, und den zwei Stämmen 842 und 845, bei denen der Biochemotyp 1676

festgestellt wurde, sind Restriktionsmuster erstellt worden, in denen es wie bei Patientin 8 ein ähnliches Grundmuster und zusätzlich variable Fragmente gibt. Die visuelle Auswertung dieser großen Anzahl (32 Stämme) ähnlicher Restriktionsmuster führt zu Ungenauigkeiten in der Interpretation. Die Stämme wurden nach den, für diese Arbeit festgelegten, Auswertungskriterien 16 verschiedenen Genotypen zugeordnet, die in weitere Subtypen differenziert wurden. Bei der vorhandenen Ähnlichkeit der Restriktionsmuster sind 16 verschiedene Genotypen aber eher unwahrscheinlich. Serologisch finden sich neben vielen nicht O-typisierbaren Stämmen und Rauhformen O 23- und O 14-Stämme. Es liegt nahe, dass es sich bei den Stämmen um wenigstens zwei verschiedene Stämme und um weitere klonale Varianten handelt. Aber selbst die Kriterien für die visuelle Auswertung von Restriktionsmustern von Tenover (88), der bei einer Differenz von 4 – 6 Fragmenten eine Verwandtschaft der Stämme noch für möglich hält, würden hier wegen der hohen Anzahl der Stämme zu keinem reellen Ergebnis führen. Letztlich bleibt der visuelle Vergleich der Fragmente subjektiv. Die verwandtschaftlichen Beziehungen dieser *E. coli*-Stämme sind am besten durch die computergestützte Fragment-Mustererkennung mit anschließender Datenverarbeitung zu klären.

5.2 Rezidiv oder Reinfektion?

Mit der Kombination von Sero- und Genotypisierung war nicht nur eine bessere Feindifferenzierung der *E. coli*-Stämme möglich, sondern auch die Differenzierung von mikrobiologischem Rezidiv und Neuinfektion. Zeiten, in denen Patienten permanent bakteriurisch waren, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt, weil Rezidiv und Reinfektion nicht unterschieden werden konnten, wenn im Rahmen der regelmäßigen Kontrollen zwischenzeitlich keine Urinprobe steril war.

Es wurden 22 (29 %) bakteriologische Rezidive und 52 (71 %) Neuinfektionen festgestellt. Die Rate der Reinfektionen ist mit der in der Literatur angegebenen Rate von 68 % – 75 % vergleichbar (38,77). Zwar werden ca. 80 % der Harnwegsinfektionen durch *E. coli* verursacht, jedoch handelt es sich in ca. dreiviertel der Fälle um Neuinfektionen mit einem genotypisch anderen *E. coli*-Stamm. Der Darm, in dem die uropathogenen *E. coli*-Stämme auch schon vor der Entwicklung einer Harnwegsinfektionen nachgewiesen werden können, dient dabei als Reservoir für die erneuten Infektionen (6,45,53,77,92,93).

5.3 Was brachte die Autovakzinierung?

Die untersuchten *E. coli*-Stämme wurden von Patienten, die ausschließlich an *E. coli* verursachten, rezidivierenden Harnwegsinfektionen litten, gesammelt. Davon ausgehend, dass es sich bei den Rezidiven auch um mikrobiologische Rezidive handelte, wurden diese Patienten im Anschluss an eine antibiotische Therapie mit einer aus dem jeweiligen Patientenstamm hergestellten monovalenten Autovakzine therapiert. Anhand der Genotypisierung wurde rückblickend der Erfolg der Vakzinierungen beurteilt.

Von 20 Vakzinestämmen wurden 16 (65 %) erfolgreich eliminiert. Die Patienten erlitten aber neue Harnwegsinfektionen mit genotypisch anderen *E. coli*-Stämmen. Patient 12 hatte über vier Jahre Harnwegsinfektionen mit sero- und biochemotypisch identischen *E. coli*-Stämmen, so dass echte mikrobiologische Rezidive vermutet wurden. Durch die Genotypisierung wurde aber ersichtlich, dass es sich um *E. coli*-Stämme verschiedener Subtypen eines Genotyps handelte und auch hier Neuinfektionen, und keine echten Rezidive, vorlagen.

Durch die Autovakzinetherapie wurden die Patienten zwar nicht gänzlich frei von HWI, aber in anderen Arbeiten wurde über eine Verbesserung der klinischen Symptomatik berichtet. Es konnte ein Wechsel von symptomatischer therapiebedürftiger Harnwegsinfektion zur asymptomatischen Bakteriurie, die keiner Therapie bedarf, beobachtet werden (91).

Davon ausgehend, dass den rezidivierenden Harnwegsinfektionen in ca. 70 % der Fälle Neuinfektionen zu Grunde liegen, würde eine Vakzine, die verschiedene Stämme beinhaltet sinnvoller sein und die Wirksamkeit verbessern. Das Präparat Uro-Vaxom® berücksichtigt diesen Fakt und beinhaltet immunogene Komponenten verschiedener uropathogener *E. coli*-Stämme.

Anhand der Ergebnisse der Genotypisierung dieser Arbeit war aber auch zu sehen, dass die verursachenden *E. coli*-Stämme der Patienten untereinander nicht vergleichbar waren, selbst wenn diese zu einer O-Serovar gehörten. Jeder Patient hat offensichtlich seinen eigenen Erregerpool, der die Harnwegsinfektionen verursacht. Eine Vakzine, hergestellt aus diesem Pool, wäre polyvalent, würde den Erregerwechseln Rechnung tragen und erzielte evt. eine bessere Wirksamkeit als Uro-Vaxom®.

5.4 Schlussfolgerungen

Für die Feindifferenzierung einer heterogenen Population von *E. coli*-Stämmen und die Erkennung klonaler Varianten ist die phänotypisierende Methode der Biochemotypisierung in Kombination mit der Serotypisierung nicht ausreichend. Identische und auch ähnliche Biochemotypen innerhalb eines Serotyps können zwar Hinweise für die Zusammengehörigkeit von Stämmen sein, lassen aber weder eine zuverlässige Aussage über die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den Stämmen zu noch die Differenzierung

von mikrobiologischem Rezidiv und Neuinfektion. Um diese Fragen zu beantworten, muss die molekularbiologische Analyse des Genoms der *E. coli*-Stämme erfolgen (z.B. durch Auftrennung von enzymatisch hergestellten DNA-Fragmenten in der Pulsfeld-Gelelektrophorese). Durch Auswertung der Fragmentmuster können die Stämme zuverlässig eingeordnet und identische Stämme und deren klonale Varianten erkannt werden. Weil diese Methode aber sehr zeit- und kostenintensiv ist, bleibt sie speziellen Fragestellungen vorbehalten und ist für die Routineanwendung nicht geeignet.

6 Zusammenfassung

Harnwegsinfektionen sind wegen der Rezidivhäufigkeit ein großes therapeutisches Problem für den Arzt und mit einer ausgesprochenen physischen und psychischen Belastung für den Patienten verbunden. Frauen sind weitaus häufiger betroffen als Männer, insbesondere nach der Pubertät in der Phase gesteigerter sexueller Aktivität.

In ca. 80 % der Fälle werden Harnwegsinfektionen durch *E. coli* verursacht. Die kausale Therapie besteht in der antibiotischen Behandlung. Sofern es sich um eine unkomplizierte Harnwegsinfektion handelt, ist der Kurzzeittherapie wegen der geringeren Auswirkungen auf die normale Vaginal- und Darmflora der Vorzug zu geben.

Antibiotische Therapien haben sich in der Vergangenheit in der Behandlung und sukzessiven Vermeidung von rezidivierenden Harnwegsinfektionen als nicht effizient erwiesen. Deswegen wurde und wird nach Therapiealternativen gesucht. Eine Option könnte die Autovakzinetherapie sein. Weil diese Therapie mit einem einzelnen Patientenisolat, also einem monvalenten Impfstoff durchgeführt wird, ist es wichtig zu wissen, ob der Patient vermeintliche Rezidive durch Neuinfektionen mit immer anderen *E. coli*-Stämmen oder echte Rezidive durch den selben, immer wieder auftretenden *E. coli*-Stamm erleidet.

Zentrale Fragestellungen in dieser Arbeit waren daher die Diskriminierung bakteriologischer Rezidiv- und Reinfektionsraten in einem ausgewählten Patientengut auf der Basis einer Feintypisierung von deren *E. coli*-Isolaten. Die Typisierung wurde mit phänotypischen (Serotypisierung, Biochemotypisierung) und genotypischen Untersuchungsmethoden (Pulsfeld-Gelelektrophorese) durchgeführt. Ferner sollte auf der Basis dieser Untersuchungen der Erfolg einer Autovakzinetherapie verifiziert werden.

Dazu wurden 172 *E. coli*-Stämme von 12 Patienten aus der nephrologischen Ambulanz der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock untersucht. Die Patienten litten an rezidivierenden Harnwegsinfektionen, die ausschließlich durch *E. coli* verursacht worden waren. Jeder Patient hatte mindestens einmal eine Autovakzinetherapie erhalten.

Der Vergleich der verschiedenen Typisierungsmethoden zeigte eine verschieden feine Differenzierung der Stämme. Die Serotypisierung nach O-, H- und K-Antigenen wird limitiert durch das Vorhandensein von nicht O-typisierbaren Stämmen und Rauformen und ist abhängig von der Anzahl der zur Typisierung verwendeten O-Antiseren. Von 172 *E. coli*-Stämmen waren 96 Stämme O-typisierbar, 46 nicht O-typisierbar und 30 Stämme Rauformen. Durch die Biochemotypisierung konnte von jedem Stamm ein Biochemotyp ermittelt werden, der aber aufgrund einer zu hohen Variabilität innerhalb einer heterogenen Stammpopulation aus verschiedenen Serotypen keine ausreichende und zuverlässige Feindiskriminierung der Stämme und Differenzierung von Rezidiv und Reinfektion zuließ.

Zusätzlich wurde jeder Stamm unter Verwendung der Pulsfeld-Gelelektrophorese genotypisiert.

Der Vergleich der Diskriminierungsfähigkeit bei Kombination von Sero- und Biochemotypisierung und Sero- und Genotypisierung zeigte eine feinere Differenzierung der Stämme und zuverlässigere Aussagefähigkeit zu Rezidiv und Reinfektion bei Anwendung von Sero- und Genotypisierung. So wurden in 71 % Reinfektionen und in 29 % bakteriologische Rezidive festgestellt. Auch der Erfolg der Autovakzinierung wurde anhand der Ergebnisse der Genotypisierung beurteilt. Aus den Restriktionsmustern war ersichtlich, dass 65 % der Vakzinestämme nach Durchführung der Vakzinierung eliminiert werden konnten. Trotz der guten Eliminierungsrate erlitten die Patienten neue Harnwegsinfektionen mit anderen *E. coli*-Stämmen. Der Reinfektionsrate von ca. 70 % würde eine polyvalente Vakzine besser begegnen. Da jeder Patient seinen eigenen Erregerpool trägt, wäre eine daraus hergestellte Vakzine nicht nur polyvalent, sondern auch patientenspezifisch. Möglicherweise wäre diese sogar besser wirksam als das Präparat Uro-Vaxom®, das ein Extrakt immunogener Komponenten verschiedener uropathogener *E. coli*-Stämme ist.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Achtman M, Heuzenroeder M, Kusecek B et al. Clonal analysis of *Escherichia coli* O2:K1 isolated from diseased humans and animals. *Infect Immun.* 1986;51(1):268-276.
- (2) Achtman M, Mercer A, Kusecek B et al. Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. *Infect Immun.* 1983;39(1):315-335.
- (3) Achtman M, Pluschke G. Clonal analysis of descent and virulence among selected *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol.* 1986;40:185-210.
- (4) Barnett BJ, Stephens DS. Urinary tract infection: an overview. *Am J Med Sci.* 1997;314(4):245-249.
- (5) Bauer HW, Rahlfs VW, Lauener PA, Blessmann GS. Prevention of recurrent urinary tract infections with immuno-active *E. coli* fractions: a meta-analysis of five placebo-controlled double-blind studies. *Int J Antimicrob Agents.* 2002;19(6):451-456.
- (6) Bergstrom T, Lincoln K, Orskov F et al. Studies of urinary tract infections in infancy and childhood. 8. Reinfection vs. relapse in recurrent urinary tract infections. Evaluation by means of identification of infecting organisms. *J Pediatr.* 1967;71(1):13-20.
- (7) Bingen EH, Denamur E, Elion J. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7(3):311-327.
- (8) Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Blanco J. Virulence factors and O groups of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and asymptomatic bacteriuria. *Eur J Epidemiol.* 1996;12(2):191-198.
- (9) Bohm H, Karch H. DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 1992;30(8):2169-2172.
- (10) Bruhl P, Heinrich J, Hacker J. [Immunotherapy of urinary tract infections]. *Urologe A.* 1992;31(1):37-42.
- (11) Budde E, Naumann G, Nimmich W, Straube E. [*Escherichia coli* O Serotyping in different patients groups with urinary tract infections (author's transl)]. *Infection.* 1980;8(1):22-26.
- (12) Chetoui H, Melin P, Struelens MJ et al. Comparison of biotyping, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis for investigation of a common-source outbreak of *Burkholderia pickettii* bacteremia. *J Clin Microbiol.* 1997;35(6):1398-1403.
- (13) Crichton PB, Old DC. Biotyping of *Escherichia coli*. *J Med Microbiol.* 1979;12(4):473-486.
- (14) Crichton PB, Old DC. Differentiation of strains of *Escherichia coli*: multiple typing approach. *J Clin Microbiol.* 1980;11(6):635-640.
- (15) Crichton PB, Old DC. An interesting problem of strain identification with urinary isolates of *Escherichia coli*. *J Hosp Infect.* 1986;7(1):34-41.

- (16) Crichton PB, Old DC. Numerical index of the discriminatory ability of biotyping and resistotyping for strains of *Escherichia coli*. *Epidemiol Infect.* 1992;108(2):279-286.
- (17) Crichton PB, Taylor A. Biotyping of *Escherichia coli* in microwell plates. *Br J Biomed Sci.* 1995;52(3):173-177.
- (18) Davies BI. Biochemical typing of urinary *Escherichia coli* strains by means of the API 20 E enterobacteriaceae system. *J Med Microbiol.* 1977;10(3):293-298.
- (19) Durant L, Metais A, Soulama-Mouze C et al. Identification of candidates for a subunit vaccine against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2007;75(4):1916-1925.
- (20) Eden CS, Hagberg L, Hanson LA et al. Adhesion of *Escherichia coli* in urinary tract infection. *Ciba Found Symp.* 1981;80:161-187.
- (21) Falkenhagen U. Erreger-Wirt-Beziehungen bei chronischer Pyelonephritis. 1985.
- (22) Funfstuck R, Stein G, Naber KG et al. [Nephrology-part 3: Urinary tract infections]. *Med Klin (Munich).* 2003;98(7):377-387.
- (23) Gargan R, Brumfitt W, Hamilton-Miller JM. A concise biotyping system for differentiating strains of *Escherichia coli*. *J Clin Pathol.* 1982;35(12):1366-1369.
- (24) Gärtner, L., Nimmich, W., Budde, E., and Schmidt, H. Antikörpernachweis bei der Immunisierung von Kaninchen mit verschiedenen *E. coli*-O-Antigenen mittels indirekter Immunfluoreszenz im Vergleich zur indirekten Hamagglutination und Widal-Reaktion. 1235-1239. 1974. deutsch. *Gesundh.-Wesen* 26.
- (25) Gatterman, S., Podschun, R., Schmidt, H., Wittke, J.-W., Naber, K., Fünfstück, E., and Straube, E. MIQ Harnwegsinfektionen. 1-42. 2003.
- (26) Gonzalez-Pedraza AA, Luis HR, Luna AJ et al. [Urinary tract infection by *Candida* species]. *Aten Primaria.* 2006;38(3):147-153.
- (27) Hacker J. Genetik der Bakterien. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, editors. *Medizinische Mikrobiologie*. München, Jena: 2001: 180-97.
- (28) Hacker J, Blum-Oehler G, Hochhut B, Dobrindt U. The molecular basis of infectious diseases: pathogenicity islands and other mobile genetic elements. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2003;50(4):321-330.
- (29) Hacker J, Kaper JB. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:641-679.
- (30) Heesemann J. [Molecular biological typing methods for infectious agents: microbiological criminology]. *Immun Infekt.* 1995;23(1):3.
- (31) Heesemann J. Die Familie der Enterobacteriaceae. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, editors. *Medizinische Mikrobiologie*. München, Jena: Urban und Fischer, 2001: 283-315.
- (32) Herold G. Niere. In: Herold G, editor. *Innere Medizin*. Köln: 1997: 492-529.

- (33) Hertting O, Chromek M, Slamova Z et al. Cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) induces an inflammatory response in the urinary tract in vitro but not in vivo. *Toxicon*. 2008;51(8):1544-1547.
- (34) Hooton TM. The current management strategies for community-acquired urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am*. 2003;17(2):303-332.
- (35) Hopkins WJ, Uehling DT. Vaccine Development for the Prevention of Urinary Tract Infections. *Curr Infect Dis Rep*. 2002;4(6):509-513.
- (36) Huland H, Conrad S. Harnwegsinfektionen. Urologie. Heidelberg: Springer-Verlag, 2001: 139-60.
- (37) Jordens JZ. Restriction enzyme analysis of chromosomal DNA and its application in epidemiological studies. *J Hosp Infect*. 1991;18 Suppl A:432-437.
- (38) Karkkainen UM, Ikaheimo R, Katila ML, Siitonen A. Recurrence of urinary tract infections in adult patients with community-acquired pyelonephritis caused by *E. coli*: a 1-year follow-up. *Scand J Infect Dis*. 2000;32(5):495-499.
- (39) Kass EH. Asymptomatic infections of the urinary tract. 1956. *J Urol*. 2002;167(2 Pt 2):1016-1019.
- (40) Kauffmann F. Über neue thermolabile Körperantigene der Coli-Bakterien. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1943;20:21-44.
- (41) Kauffmann F. Zur Serologie der Coli-Gruppe. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1944;21:20-45.
- (42) Kauffmann F. The serology of the coli group. *J Immunol*. 1947;57:71.
- (43) Keller CK, Burkarth CM, Geberth SK. Harnwegsinfektionen. In: Keller CK, editor. Praxis der Nephrologie. Berlin: Springer-Verlag, 2002: 99-140.
- (44) Krcmery S, Dubrava M, Krcmery V, Jr. Fungal urinary tract infections in patients at risk. *Int J Antimicrob Agents*. 1999;11(3-4):289-291.
- (45) Kunin CM. A ten-year study of bacteriuria in schoolgirls: final report of bacteriologic, urologic, and epidemiologic findings. *J Infect Dis*. 1970;122(5):382-393.
- (46) Lauener PA. Orale Immunstimulation vermindert die Anfälligkeit für Harnwegsinfektionen. *Jatros Urologie Nephrologie Sonderdruck*. In press.
- (47) Madersbacher S, Thalhammer F, Marberger M. Pathogenesis and management of recurrent urinary tract infection in women. *Curr Opin Urol*. 2000;10(1):29-33.
- (48) Manski D. Perioperatives Management. In: Manski D, editor. Urologielehrbuch. 2008.
- (49) Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis*. 1993;17(2):153-162.
- (50) McClelland M, Jones R, Patel Y, Nelson M. Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. 1987;15(15):5985-6005.

- (51) Metz, Michaela, Linde, Hans-Jörg, Lehn, Norbert, and Ehret, Werner. Die Pulsfeld-Gelelektrophorese zur epidemiologischen Analyse pathogener Keime. Biospektrum , 53-54. 1996.
- (52) Meyrier A. [Acute pyelonephritis]. *Rev Prat.* 2003;53(16):1777-1784.
- (53) Mitsumori K, Terai A, Yamamoto S, Yoshida O. Virulence characteristics and DNA fingerprints of *Escherichia coli* isolated from women with acute uncomplicated pyelonephritis. *J Urol.* 1997;158(6):2329-2332.
- (54) Moreno E, Andreu A, Pigrau C et al. Relationship between *Escherichia coli* Strains Causing Acute Cystitis in Women and the Host's Fecal *E. coli* Population. *J Clin Microbiol.* 2008.
- (55) Naber, K. Rationale Diagnostik und Therapie von Harnwegsinfektionen. 37, 328-334. 1997. Urologe, Springer-Verlag.
- (56) Naber, K., Fünfstück, R., Hofstetter, A., Brühl, P., and Hoyme, U. Empfehlung zur antimikrobiellen Therapie von Infektionen der Nieren und des Urogenitaltraktes bei Erwachsenen. 1-27. 25-8-2000.
- (57) Naumann, G., Schmidt, H., and Schmidt, R. Moderne Trends in der Behandlung von Harnwegsinfektionen. 37, 201-205. 1991. Klinisches Labor.
- (58) Navas-Nacher EL, Dardick F, Venegas MF et al. Relatedness of *Escherichia coli* colonizing women longitudinally. *Mol Urol.* 2001;5(1):31-36.
- (59) Neu HC. Urinary tract infections. *Am J Med.* 1992;92(4A):63S-70S.
- (60) Nimmich W, Gartner L, Budde E, Naumann G. [Serogrouping of *Escherichia coli* from urinary tract infections (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol [Orig A]*. 1975;230(1):28-37.
- (61) Nimmich W, Zingler G. [Relation between the O:K:H serotype and the fimbria antigen in *E. coli* of urinary tract infections]. *Z Urol Nephrol.* 1984;77(6):343-349.
- (62) Old DC, Crichton PB, Maunder AJ, Wilson MI. Discrimination of urinary strains of *Escherichia coli* by five typing methods. *J Med Microbiol.* 1980;13(3):437-444.
- (63) Orskov F, Orskov I. *Escherichia coli* O:H serotypes isolated from human blood. Prevalence of the K1 antigen with technical details of O and H antigenic determination. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl.* 1975;83(6):595-600.
- (64) Orskov, F. and Orskov, I. Serotyping of *Escherichia coli*. 14, 43-111. 1984. London.
- (65) Orskov F, Orskov I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol.* 1992;38(7):699-704.
- (66) Orskov I, Orskov F, Birch-Andersen A et al. O, K, H and fimbrial antigens in *Escherichia coli* serotypes associated with pyelonephritis and cystitis. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1982;33:18-25.
- (67) Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev.* 1977;41(3):667-710.

- (68) Perrotta C, Aznar M, Mejia R et al. Oestrogens for preventing recurrent urinary tract infection in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;(2):CD005131.
- (69) Pfaller MA, Wendt C, Hollis RJ et al. Comparative evaluation of an automated ribotyping system versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* from patients with recurrent gram-negative bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1996;25(1):1-8.
- (70) Poh CL, Yeo CC, Tay L. Genome fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping to differentiate *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1992;11(9):817-822.
- (71) Ratiner, Yu. A. Rapid diagnostic system for the identification of *Escherichia coli* H-antigens. 37-41, 37-41. 1983. *Z. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol*. 2/1983.
- (72) Real JM, Munro P, Buisson-Touati C et al. Specificity of immunomodulator secretion in urinary samples in response to infection by alpha-hemolysin and CNF1 bearing uropathogenic *Escherichia coli*. *Cytokine*. 2007;37(1):22-25.
- (73) Riedasch, G. and Möhring, K. Immunisierungstherapie rezidivierender Harnwegsinfektionen der Frau. *Therapiewoche* 10, 896-900. 1986.
- (74) Romling U, Fislage R, Tummeler B. [Theory and practice of macrorestriction analysis for the clonal analysis of pathogens]. *Immun Infekt*. 1995;23(1):4-8.
- (75) Romling U, Grothues D, Heuer T, Tummeler B. Physical genome analysis of bacteria. *Electrophoresis*. 1992;13(9-10):626-631.
- (76) Russo TA, McFadden CD, Carlino-MacDonald UB et al. IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2002;70(12):7156-7160.
- (77) Russo TA, Stapleton A, Wenderoth S et al. Chromosomal restriction fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli* strains causing recurrent urinary tract infections in young women. *J Infect Dis*. 1995;172(2):440-445.
- (78) Sader HS, Hollis RJ, Pfaller MA. The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. *Clin Lab Med*. 1995;15(2):407-431.
- (79) Sahl HG, Hacker J, Köhler W et al. Allgemeine Bakteriologie. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B et al, editors. Medizinische Mikrobiologie. München, Jena: Urban und Fischer, 2001: 156-246.
- (80) Schmidt H. Orale Immunstimulation vermindert die Anfälligkeit für Harnwegsinfektionen. *Jatros Urologie Nephrologie Sonderdruck*. 1992;15-16.
- (81) Schulman CC, Corbusier A, Michiels H, Taenzer HJ. Oral immunotherapy of recurrent urinary tract infections: a double-blind placebo-controlled multicenter study. *J Urol*. 1993;150(3):917-921.
- (82) Sobel JD. Bacterial etiologic agents in the pathogenesis of urinary tract infection. *Med Clin North Am*. 1991;75(2):253-273.

- (83) Stille W, Brodt H-R, Groll AH, Just-Nübling G. Antibiotika-Therapie Klinik und Praxis der antiinfektiösen Behandlung. 11 ed. Stuttgart: Schattauer, 2006.
- (84) Straube, E. Versuche zur Autovakzinebehandlung von Ratten mit experimenteller Pyelonephritis. Dissertation. 1987.
- (85) Svanborg C, Bergsten G, Fischer H et al. The 'innate' host response protects and damages the infected urinary tract. *Ann Med*. 2001;33(9):563-570.
- (86) Svanborg EC, de Man P. Bacterial virulence in urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am*. 1987;1(4):731-750.
- (87) Talan DA, Naber KG, Palou J, Elkharrat D. Extended-release ciprofloxacin (Cipro XR) for treatment of urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2004;23 Suppl 1:S54-S66.
- (88) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33(9):2233-2239.
- (89) Vagarali MA, Karadesai SG, Patil CS et al. Haemagglutination and siderophore production as the urovirulence markers of uropathogenic Escherichia coli. *Indian J Med Microbiol*. 2008;26(1):68-70.
- (90) Weir M, Brien J. Adolescent urinary tract infections. *Adolesc Med*. 2000;11(2):293-313.
- (91) Weiß K. Autovakzinetherapie bei Patienten mit chronisch rezidivierenden Harnwegsinfektionen hervorgerufen durch Escherichia coli. 1997.
- (92) Winberg J, Andersen HJ, Bergstrom T et al. Epidemiology of symptomatic urinary tract infection in childhood. *Acta Paediatr Scand Suppl*. 1974;(252):1-20.
- (93) Yamamoto S, Tsukamoto T, Terai A et al. Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by Escherichia coli. *J Urol*. 1997;157(3):1127-1129.
- (94) Zingler, G. Feincharakterisierung uropathogener Escherichia coli Stämme. Habilitationsschrift. 1991.
- (95) Zingler G, Reissbrodt R, Falkenhagen U, Naumann G. Biochemical and serological patterns of Escherichia coli O2 strains isolated from patients with urinary tract infections. *Zentralbl Bakteriol*. 1992;276(2):288-296.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Ellen Mann, an Eides statt, dass die vorgelegte Arbeit von mir selbstständig und nur unter Anwendung der darin angegebenen Hilfsmitteln verfasst wurde.

Rostock, März 2009

Ellen Mann

Thesen

1. Harnwegsinfektionen sind häufig auftretende und aufgrund der Rezidivneigung klinisch relevante Infektionen. Frauen sind wegen der anatomischen Nähe zwischen perinealer und periurethraler Region häufiger betroffen als Männer. Auslöser sind uropathogene Keime, die den Darm besiedeln, am häufigsten *E. coli*.
2. Voraussetzung für eine Infektion ist die Adhäsion der Erreger an Uroepithelien und deren Aszension. Dazu stehen den Erregern spezifische Faktoren wie Adhäsine zur Verfügung.
3. Harnwegsinfektionen werden möglichst nach Resistogramm mit Antibiotika behandelt. Die Therapiedauer ist abhängig von dem Schweregrad der Infektion. Trotz suffizienter antibiotischer Therapie erleiden die Patienten häufig Rezidive.
4. Die Autovakzinetherapie könnte eine Option als Ergänzung zur antibiotischen Therapie sein. Weil die Vakzine aus einem einzelnen patienteneigenen Stamm hergestellt wird, ist es wichtig zu wissen, ob es sich bei den immer wieder auftretenden Harnwegsinfektionen um echte, sprich mikrobiologische Rezidive handelt oder ob Neuinfektionen mit anderen *E. coli*-Stämmen die Ursache sind.
5. Die Klärung von Rezidiv oder Neuinfektion ist abhängig von der Diskriminierungsfähigkeit der angewendeten Feintypisierungsmethoden.
6. In dieser Arbeit wurden 12 Patienten der nephrologischen Ambulanz der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock, die an rezidivierenden Harnwegsinfektionen, verursacht durch *E. coli*, erkrankt waren, eingeschlossen. Es wurden 172 Stämme isoliert. Die Patienten hatten jeweils ein bis vier Autovakzinetherapien erhalten.
7. Alle *E. coli*-Stämme wurden phänotypisch durch die Serotypisierung und die Biochemotypisierung sowie genotypisch durch die Pulsfeld-Gelelektrophorese untersucht.
8. Das häufigere Auftreten von Rauhformen und nicht typisierbaren Stämmen limitiert die Aussage der Serotypisierung. Unter der Anwendung von 31 monovalenten O-Antiseren waren 96 Stämme O-typisierbar, 46 Stämme waren nicht typisierbar und 30 Stämme lagen als Rauhform vor.
9. Mit der Biochemotypisierung konnte von jedem Stamm der Biochemotyp bestimmt werden. Während in einer homogenen Stammpopulation, wie beispielsweise innerhalb einer Serovar, mit der Biochemotypisierung eine sehr gute Feindiskriminierung erreicht wird, führt diese Methode in einer heterogenen Stammpopulation, wie sie in dieser Arbeit vorlag, zu keiner ausreichenden Feintypisierung. Die Zugehörigkeit von Stämmen und die Klärung von Rezidiv oder Reinfektion waren dadurch nicht ausreichend möglich.

10. Die beste Feindiskriminierung der untersuchten *E. coli*-Stämme wurde durch die enzymatische Auftrennung des bakteriellen Genoms und Separierung der Fragmente in der Pulsfeld-Gelelektrophorese erreicht.
11. Während die visuelle Auswertung der Restriktionsmuster für eindeutig identische oder differente Stämme ausreichend ist, gestaltet sich die Auswertung mehrerer Stämme mit ähnlichem Grundmuster als schwierig. Hier wird die Computer gestützte Fragment-Mustererkennung und anschließende Datenanalyse notwendig, um Aussagen zu verwandtschaftlichen Zugehörigkeiten der Stämme treffen zu können.
12. Bei den Methoden der Phänotypisierung werden Stoffwechseleigenschaften untersucht, deren Expression von äußeren Faktoren abhängig sind. So kann der Phänotyp in vivo und vitro zu differenten Ergebnissen führen. Deshalb ist genotypisierenden Methoden der Vorzug zu geben.
13. Die Differenzierung von klinischem und mikrobiologischem Rezidiv erfolgte anhand der Ergebnisse der Restriktionsmusteranalyse. Danach lagen in 71 % der Fälle Reinfektionen und in 29 % der Fälle Rezidive vor.
14. In 65 % der durchgeführten Vakzinierungen konnte der Vakzinestamm erfolgreich eliminiert werden. Dennoch erlitten die Patienten Reinfektionen mit anderen *E. coli*-Stämmen. Eine monovalente Autovakzinierung wäre nur im Falle von Rezidiven mit immer demselben *E. coli*-Stamm sinnvoll, denn die induzierte Antikörperbildung erfolgt überwiegend nur gegen das applizierte Antigen. Deshalb erscheint die Anwendung einer polyvalenten Vakzine mit uropathogenen Stämmen sinnvoller.
15. In klinischen Studien konnte aber trotzdem ein positiver Effekt der Autovakzinierung festgestellt werden. So nahm die klinische Rezidivhäufigkeit ab. Gleichzeitig war ein Wechsel von symptomatischer behandlungsbedürftiger Harnwegsinfektion zur asymptomatischen und nicht therapiebedürftigen Bakteriurie zu verzeichnen.
16. Das Problem des Erregerwechsels berücksichtigend steht zur Immunstimulation die polyvalente Vakzine Uro-Vaxom® zur Verfügung. Diese richtet sich gegen verschiedene uropathogene *E.coli*-Stämme und induziert damit zwar ein breiteres Spektrum an Antikörpern, ist aber nicht patientenspezifisch.
17. Durch die Genotypisierung konnte auch gezeigt werden, dass jeder Patient seinen eigenen Erregerpool hat, und dass Stämme einer O-Serovar von verschiedenen Patienten auch zu verschiedenen Genotypen gehören. Eine Autovakzine, hergestellt aus dem patienteneigenen Erregerpool wäre nicht nur polyvalent sondern auch patientenspezifisch.

18. Die Herstellung und Anwendung der Autovakzine ist verglichen mit der Anwendung von Uro-Vaxom® kostenintensiver. Wie nach der Autovakzinetherapie, so ist auch nach Anwendung von Uro-Vaxom® eine Abnahme der Rezidivhäufigkeit von behandlungsbedürftigen Harnwegsinfektionen in der Literatur beschrieben. Eine Wiederholung der Vakzinierung scheint bei beiden Therapien notwendig.